

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**

**“DETERMINANTES MOLECULARES IMPLICADOS EN EL  
TRÁFICO INTRACELULAR DEL TRANSPORTADOR DE COBRE  
ATP7B, RESPONSABLE DE LA ENFERMEDAD DE WILSON”**

**Memoria presentada por Sonia Hernández Tiedra para optar al grado de  
Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**Madrid, Junio del 2008**



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. Compartimentalización y tráfico de proteínas en la célula eucariota .....	7
2. El tráfico de proteínas en las células epiteliales.....	13
3. La ruta endocítica en las células epiteliales .....	19
4. El metabolismo del cobre.....	20
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>I. Distribución del transportador de cobre, ATP7B, en el hepatocito. ....</b>	<b>51</b>
1. El compartimento de retención de ATP7B. ....	51
1.1. Antecedentes experimentales.....	51
1.2. El modelo de células Can10 y la obtención del anticuerpo Ab1.....	51
1.3 La retención intracelular de ATP7B en células Can10 cultivadas en condiciones fisiológicas.....	52
1.4 ATP7B es retenido en el mismo compartimento de la red trans del Golgi que la t-SNARE syntaxina 6.....	52
1.5 ATP7B y ATP7A son retenidos en compartimentos diferentes dentro del aparato de Golgi. ....	56
1.6 ATP7A es retenido en la red cis del Golgi (CGN). ....	58
1.7 ATP7B es retenido en el mismo compartimento de la TGN que el transportador de Glucosa sensible a insulina GLUT4.....	60
2. ATP7B es translocado desde la TGN al canalículo biliar, en respuesta al aumento del cobre intracelular. ....	66
2.1. Antecedentes experimentales.....	66
2.2. Estudio de la respuesta de ATP7B al aumento en los niveles de cobre celular. ....	67
<b>II. Caracterización de las señales de retención y tráfico en ATP7B.....</b>	<b>73</b>
3. Estudio de los mutantes de ATP7B.....	73
3.1 Producción de los mutantes.....	73
3.2 Estudio del mutante ATP7B $\Delta$ 8 y su comparación con el mutante Glut4 $\Delta$ 5.....	75

---

3.3	Estudio de la señal dileucina del transportador de cobre ATP7B.....	76
3.4	Estudio del efecto de las variaciones intracelulares de cobre sobre los mutantes ATP7B $\Delta$ 8, K <sup>1448</sup> E, L <sup>1451</sup> S, L <sup>1452</sup> S, D <sup>1447</sup> R, L <sup>1453</sup> S, en células COS-7 transfectadas.....	79
<b>III.</b>	<b>Una nueva localización de ATP7B en el hepatocito.....</b>	<b>85</b>
4.	ATP7B se asocia de manera estable a las “tight junctions”.....	85
4.1	Desarrollo del anticuerpo Ab2 4P.....	85
4.2	Estudio por Western de la reactividad de los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P con ATP7B. ....	86
4.3	Estudio inmunohistoquímico de ATP7B en secciones de hígado de rata. 87	
4.4	ATP7B, se localiza en las <i>tight junctions</i> de células WIF-B9 polarizadas.....	90
4.5	El anticuerpo Ab2 4P ATP7B no reacciona con las <i>tight junctions</i> de células que no expresan ATP7B.....	92
4.6	La población de ATP7B asociada con las <i>tight junctions</i> es estable y no sufre cambios en respuesta a variaciones en las concentraciones de cobre celular. ....	94
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>137</b>



## ABREVIATURAS



<b>aa</b>	aminoácidos
<b>Ab1</b>	Anticuerpo policlonal desarrollado contra el extremo amino terminal del transportador de cobre humano, ATP7B
<b>Ab2 4P</b>	Anticuerpo policlonal producido contra 4 péptidos presentes en la secuencia de aa del ATP7B de ratón
<b>AEE</b>	Endosoma temprano apical
<b>AJ</b>	Unión Adherente
<b>APs</b>	Adaptadores de proteína
<b>ARE</b>	Endosoma de reciclamiento apical
<b>BEE</b>	Endosoma temprano apical
<b>BCS</b>	Bazocupreína
<b>BFA</b>	Brefeldina A
<b>BSA</b>	Suero de Albúmina bovina
<b>CASK/Lin2</b>	Acrónimo de “calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase”
<b>CB</b>	Canalículo Biliar
<b>CE</b>	Endosoma Común
<b>CGN</b>	Red <i>cis</i> del Golgi
<b>COS-7</b>	Células del riñón del mono verde africano
<b>DMEN</b>	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>DAB</b>	3-3´Diamino Benzidina
<b>DTT</b>	1,4-Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Tetraacetato de Etilendiamina
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GGAs</b>	proteínas que interaccionan con ARF, homólogas de la gamma adaptina y asociadas al Golgi
<b>Glc Cer</b>	Glucosilceramida
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa sensible a insulina
<b>GPI</b>	Glucosilfosfatidilinositol
<b>GSC</b>	Compartimento de retención y almacenamiento de GLUT4
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HepG2</b>	Células de carcinoma hepatocelular humano
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>JAMs</b>	Moléculas de adhesión. Acrónimo de “junctional adhesión molecules”
<b>KLH</b>	Hemocianina, proteína del Keyhole limpet

<b>LAVs</b>	Vesículas grandes ácidas
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LE</b>	Endosoma tardío
<b>LEC</b>	Lond Evans Cinnamon
<b>LIMPII</b>	Proteína integral de membrana lisosomal II
<b>LPH</b>	Hormona Lipotrópica
<b>MAGI-1</b>	Acrónimo de “membrana-associated guanylate kinase with invertid domain structure 1”
<b>MAGUK</b>	Acrónimo de “membrane associated guanylate kinase”
<b>MRP-2</b>	Proteína de resistencia a múltiples drogas-2
<b>MUPP1</b>	Acrónimo de “multiple PDZ domain protein 1”
<b>NRK</b>	“Normal Rat Kidney”: células de riñón de rata
<b>NSF</b>	Factor sensible a N-etilmaleimida
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>pb</b>	Par de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>pIg R</b>	receptor de inmunoglobulinas poliméricas
<b>pIg A</b>	inmunoglobulina A polimérica
<b>PALS1</b>	Proteína asociada con Lin seven 1
<b>Par3</b>	Acrónimo de “Partitioning defective 3”
<b>PATJ</b>	Proteína de la TJ asociada a PALS1. “PALS1-associated TJ protein”
<b>PML</b>	Proteína de la leucemia promielocítica
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil-metil-sulfonato
<b>p75NTR</b>	Receptor para la neurotrofina p75
<b>RACE</b>	Extensión y amplificación rápida de los extremos de un cDNA
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAC</b>	Compartimento Subapical
<b>SAVs</b>	Vesículas pequeñas ácidas
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SGC</b>	Cisternas del Golgi
<b>SH3</b>	Acrónimo de “Src homology 3 domain”
<b>SM</b>	Esfingomielina
<b>SNAP</b>	Proteína soluble de unión a NSF
<b>SNARE</b>	Receptor de SNAP

<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TER</b>	Resistencia eléctrica transepitelial
<b>TfR</b>	Receptor para la transferrina
<b>TGN</b>	Red <i>trans</i> del Golgi
<b>TJ</b>	“tight junction”: unión estanca
<b>ZONAB</b>	ZO-1 associated nucleic acid-binding protein.
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens-1

**RESUMEN**

---



Copper is a heavy metal ion that is essential for the activity of a variety of proteins in living organisms, but excess copper is highly toxic. The two copper transporters, specialized in pumping copper out of cells, the ubiquitous ATP7A and the ATP7B expressed in liver, brain, kidney and placenta, are highly homologous and play an important role in copper homeostasis. In liver ATP7B plays the critical role of excreting excess copper into the bile, the major route of copper elimination in mammals.

ATP7B and ATP7A display a copper regulated trafficking. Under basal conditions the two transporters are retained in the Golgi where they supply copper to newly synthesized proteins in need of it (Bingham, Ong et al. 1996; Dierick, Adam et al. 1997; Nagano, Nakamura et al. 1998; Suzuki and Gitlin 1999; Lockhart and Mercer 2001; Huster, Hoppert et al. 2003). Studies on the retention of ATP7B and ATP7A in the Golgi have described their retention in the TGN (Suzuki and Gitlin 1999). Excess copper provoke their release from the Golgi. Whereas released ATP7A is targeted to the basolateral plasma membrane, recent models described the targeting of ATP7B to endosomes that once filled with copper, and after the recycling of ATP7B to the TGN, they fuse with the plasma membrane to dispose the copper load (Petris, Mercer et al. 1996; Forbes, Hsi et al. 1999; Roelofsen, Wolters et al. 2000).

In this thesis we have characterized the Golgi compartment where ATP7A and ATP7B are retained. We find that whereas ATP7A is localized in the earlier cis-Golgi network, ATP7B is retained in a TGN subcompartment that also houses GLUT4, the insulin-dependent glucose transporter that is translocated to plasma membrane upon stimulation with insulin.

Moreover, contrary to current models we find in hepatoma cells incubated with excess copper, that ATP7B is massively download into the bile canalicular membrane.

As part of the effort to further characterize the motifs involved in the intracellular retention and traffic of ATP7B, we report the role of three separate residues in the retention of ATP7B in the Golgi, the traffic through the subapical compartment and in its endocytosis. We have seen that the removal of the acidic cluster in the C-terminal of ATP7B shifts its distribution from the Golgi to vesicles, and on the other hand, the mutation of the residues: K<sup>1448</sup>, Leu<sup>1451</sup> and the Leu<sup>1452</sup> and the Leu<sup>1453</sup> in the D<sup>1447</sup>KXXLL motif prevents the translocation of ATP7B to the plasma membrane, its endocytosis from the plasma membrane, and promote the retention of the ATP7B into a vesicular compartment post-TGN, respectively.





## INTRODUCCIÓN



## 1. Compartimentalización y tráfico de proteínas en la célula eucariota

La célula eucariota está subdividida en compartimentos especializados en distintas funciones. La compartimentalización añade eficacia a las reacciones químicas, evita incompatibilidades y ahorra un espacio necesario por limitado. Cada compartimento contiene juegos específicos de proteínas, que son clasificadas, transportadas y retenidas en ellos por mecanismos muy sofisticados. Para comprender la célula eucariota, es esencial no solo profundizar en los mecanismos de clasificación y transporte de las proteínas sino entender como éstas son reguladas y cómo la regulación se adapta a las necesidades de las células.

Las proteínas confieren a cada orgánulo, características estructurales y funcionales propias. En ellos funcionan como elementos estructurales y organizadores, catalizan y regulan procesos fisicoquímicos y, en casos concretos, como sucede con el transportador de cobre ATP7B, objeto de esta tesis, transportan de forma selectiva iones y moléculas a través de las membranas en las que se insertan.

La célula animal contiene alrededor de 10 mil millones ( $10^{10}$ ) de proteínas de 10.000-20.000 clases distintas, siendo sintetizadas la gran mayoría de ellas en el citoplasma, y un número reducido en las mitocondrias. Es por ello que para alcanzar los distintos orgánulos en que residen, las proteínas son distribuidas por mecanismos altamente específicos que las clasifican, transportan, y retienen en ellos de forma específica. Cada nueva proteína sintetizada alcanza pues, con una gran precisión espacial y temporal el orgánulo en que reside.

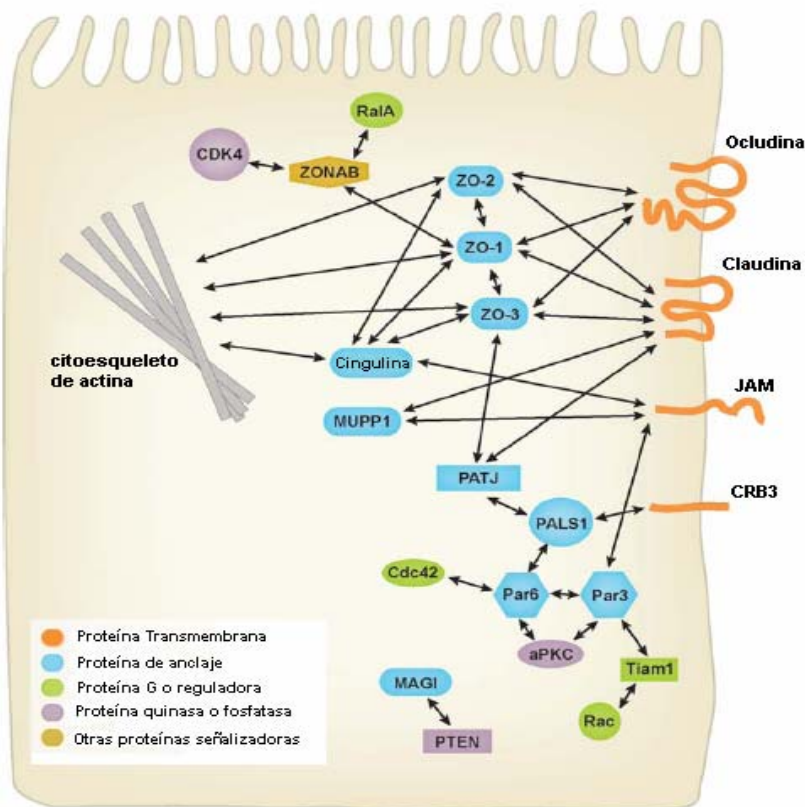
La subcompartimentalización de los orgánulos añade un plus de complejidad al fenómeno de la compartimentalización en las células eucariotas. Prácticamente todos los orgánulos están organizados en subdominios, separados o no por membranas (mitocondrias, cloroplastos), estructuras especializadas (dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, núcleo) o microdominios lipídicos.

En las células eucariotas van asociadas por tanto, la compartimentalización estructural y funcional, y aún existiendo en todas ellas, resulta más patente en las células polarizadas. En el caso de la membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas, ésta se divide en dos dominios bien diferenciados tanto espacial como fisicoquímica y funcionalmente: los dominios apical y basolateral, que separados por las *tight junctions* (TJs), relacionan a la célula con diferentes medios, siendo éstos a veces, el externo (lumen intestinal, bronquiloar, canalículo

biliar...) e interno (circulación sanguínea), respectivamente (Simons and Fuller 1985). Las TJs juegan un papel muy importante en la organización de la polaridad de las células epiteliales y endoteliales, restringiendo el movimiento de lípidos y proteínas de membrana entre los dominios apical y basolateral de las células, y estableciendo una barrera apico-lateral que regula la difusión de solutos a través del espacio intercelular (Matter and Balda 2003).

### 1.1 Las *tight junctions*.

Las TJs están formadas por tres familias principales de proteínas transmembrana, las ocludinas, claudinas y las moléculas de adhesión intercelular o JAMs<sup>1</sup> (Tsukita, Furuse et al. 1999); y un gran número de proteínas periféricas citoplasmáticas, entre las que destacan las proteínas ZO-1, -2 y -3, que utilizan sus dominios PDZ para formar el andamiaje al que se unen un sinnúmero de proteínas estructurales como la actina, y señalizadoras como quinasas, fosfatasas, GTPasas y factores de transcripción (Itoh, Furuse et al. 1999; Wittchen, Haskins et al. 1999; Balda and Matter 2000; Shin, Fogg et al. 2006). En la figura 1, se muestra un esquema que resume las interacciones existentes entre las distintas proteínas localizadas en las TJs.



**Figura 1 | Proteínas componentes de las *tight junctions*: estructura e interacciones.** Esta figura ha sido modificada de la original presentada en la revisión (Shin, Fogg et al. 2006).

<sup>1</sup>. Acrónimo descrito en la página de Abreviaturas

Entre las proteínas transmembrana que forman las TJs, la **occludina** fue la primera en ser identificada como componente de ellas (Furuse, Hirase et al. 1993). La ocludina posee cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y dos dominios N- y C-terminales intracelulares. Su extremo C-terminal interacciona directamente con las proteínas de la “zonula ocludens”, ZO-1, -2 y -3, que a su vez actúan como puentes entre la ocludina, de una parte, y el citoesqueleto de actina, y las moléculas JAMs de otra (Mandell and Parkos 2005), siendo fundamental esta cadena de interacciones para el ensamblaje de las TJs al citoesqueleto y su regulación. La ocludina juega un papel extraordinariamente importante en la selectividad del transporte paracelular de solutos, se ha visto que la transfección de células MDCK II con un mutante de ésta carente de su extremo carboxilo, provoca un aumento en la permeabilidad paracelular (Balda, Whitney et al. 1996). La ocludina también ha sido implicada en el ensamblaje de las TJs durante el desarrollo embrionario de *Xenopus* (Chen, Merzdorf et al. 1997), en la adhesión intercelular (Van Itallie and Anderson 1997) y en la regulación de la señalización celular (Li and Mrsny 2000; Wang, Mandell et al. 2005).

Las **claudinas** son una familia de proteínas que, al igual que las ocludinas, presentan cuatro dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y dos intracelulares. Las primeras claudinas en ser identificadas fueron la 1 y 2 (Furuse, Fujita et al. 1998) habiéndose identificado hasta el momento hasta veinticuatro claudinas. Su función es mediar la adhesión celular independiente de calcio, por lo que juegan un papel muy importante en el ensamblaje y función de las TJs (Furuse, Sasaki et al. 1998). El dominio C- terminal de las claudinas contiene sitios de unión PDZ altamente conservados, que interaccionan directamente con proteínas periféricas como las ZO-1, -2 y -3 y PATJ<sup>1</sup> (Roh, Liu et al. 2002). Las diferencias entre las TJs de distintos tipos celulares, vienen determinadas por las diferentes combinaciones entre las distintas isoformas de las claudinas. Por ejemplo, las células MDCK de tipo II expresan niveles altos de claudina 2, lo que se corresponde con baja resistencia eléctrica transepitelial (TER), indicativa del grado de sellado epitelial, mientras que las células MDCK de tipo I expresan niveles bajos de la misma y tienen una TER alta (Furuse, Furuse et al. 2001). Así, es importante señalar que mutaciones en la claudina 16, se asocian con enfermedades humanas, en las que la permeabilidad paracelular al calcio y al magnesio está impedida (Hou, Paul et al. 2005). Durante los últimos años, se han identificado varios de los mecanismos implicados en la regulación de la función de las claudinas. Así, Yamauchi y colaboradores han descrito que la serina/treonina quinasa WNK4, hiperfosforila las claudinas 1-4 y disminuye la TER incrementando la permeabilidad al cloro (Yamauchi, Rai et al. 2004). Por otra parte, D'Souza y colaboradores han demostrado que en tumores ováricos, la claudina 3 es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) y que su fosforilación aumenta la permeabilidad paracelular e interrumpe la función de las TJs como barrera selectiva de iones (D'Souza, Agarwal et al.

2005). Además, el estudio de monocapas epiteliales formadas por células intestinales tratadas con interferón gamma (INF- $\gamma$ ), ha demostrado que éste aumenta la permeabilidad paracelular y rompe la barrera epitelial, como resultado de la inducción de la endocitosis de la claudina-1 y la ocludina presentes en las TJs (Madara and Stafford 1989; Utech, Ivanov et al. 2005). Por último, se ha descrito que el factor de transcripción Snail regula la expresión de las claudinas, las E-cadherinas y la ocludina (Ikenouchi, Matsuda et al. 2003).

El tercer grupo de proteínas transmembrana identificado en las TJs, son las **moléculas de adhesión intercelular** o **JAMs**, proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan en células epiteliales, además de en leucocitos y plaquetas. Se han identificado cuatro especies de JAMs: JAM-A, -B, -C y la JAM4 o JAML (Mandell and Parkos 2005). En las células epiteliales, las JAM-A y -C se localizan en las TJs, mientras que la JAM-B reside en la membrana basolateral (Aurrand-Lions, Johnson-Leger et al. 2001). Las JAMs poseen un único dominio transmembrana, un dominio extracelular implicado en la heterodimerización de las JAM-A, -B y -C, y un dominio citoplasmático (Kostrewa, Brockhaus et al. 2001; Mandell, McCall et al. 2004). Estudios recientes han implicado a las JAMs en el ensamblaje y función de las barreras epiteliales. En consonancia con este papel, la inhibición de las JAMs con un anticuerpo monoclonal específico (mAb J3F.1), disminuye la TER y provoca defectos en el ensamblaje de las TJs (Liu, Nusrat et al. 2000). Sin embargo, se desconoce como estas proteínas intervienen en la formación de las TJs. Respecto a esto, las JAMs interactúan a través de los dominios de unión proteína-proteína PDZ, existentes en sus colas citoplasmáticas, con otras proteínas de las TJs como la ZO-1, CASK/Lin2<sup>1</sup>, MAGI-1<sup>1</sup>, MUPP1<sup>1</sup> y Par3<sup>1</sup> (Ebnet, Suzuki et al. 2001; Itoh, Sasaki et al. 2001), contribuyendo probablemente a integrarlas en las TJs y a estructurar éstas.

Respecto a las proteínas periféricas de membrana que forman parte de las TJs, ya he comentado anteriormente, que en su mayoría se unen a las proteínas transmembrana de éstas, resultando de ello su integración en las TJs, la interacción de las TJs con el citoesqueleto y la señalización celular con origen en las TJs. Entre el grupo de proteínas periféricas de membrana destacan, las proteínas de la “zonula ocludens” ZO, las MAGI<sup>1</sup>, la cingulina y la GTPasa Rab 13.

Las ZO, pertenecen a la familia MAGUK<sup>1</sup>, contienen un núcleo estructural que consiste en uno o más dominios PDZ, un dominio SH3<sup>1</sup> y un dominio GUK<sup>1</sup> (revisión en (Gonzalez-Mariscal, Betanzos et al. 2000). Existen tres isoformas de proteínas ZO: ZO-1, -2 y -3. La isoforma ZO-1 es una fosfoproteína de 220kD que se localiza en las TJs de las células epiteliales y endoteliales (Mitic and Anderson 1998), aunque también se expresa en células no

<sup>1</sup>. Acrónimo descrito en la página de Abreviaturas

epiteliales como fibroblastos, astrocitos y células de Schwann. Contiene 3 dominios PDZ, que se unen a secuencias de 3 aminoácidos en el extremo carboxilo de las proteínas transmembrana adyacentes, y es a través de esta interacción por la que controlan la dinámica del ensamblaje de las TJs. ZO-1 se une a las claudinas, ocludinas, a ZO-2, -3, a la cingulina y al citoesqueleto de actina (Cordenonsi, D'Atri et al. 1999; Wittchen, Haskins et al. 1999). Se cree que las proteínas ZO-1, -2 y -3, intervienen en la agrupación de las claudinas y las ocludinas para generar las fibrillas existentes en las TJs, mecanismo por el que probablemente regulen el tamaño de los poros dentro de éstas. La proteína ZONAB<sup>1</sup> se asocia con el dominio SH3 de ZO1 (Balda and Matter 2000).

La cingulina es una proteína de 140-160 kD, que se localiza en la superficie citoplasmática de las TJs epiteliales, e interacciona con las proteínas ZO-1, -2, -3, JAM-A y actina, actuando como nexo de unión entre ellas y el citoesqueleto de actina (Cordenonsi, D'Atri et al. 1999; Bazzoni, Martinez-Estrada et al. 2000; D'Atri and Citi 2001; D'Atri, Nadalutti et al. 2002). También existen evidencias que sugieren que la cingulina juega un papel importante en la regulación transcripcional y la proliferación celular.

Gran parte de los estudios realizados en células epiteliales durante las últimas tres décadas, han tratado de responder a la pregunta de cómo éstas mantienen su polaridad y, en consecuencia, cómo dirigen y regulan el transporte de proteínas a los dominios apical y basolateral de su membrana plasmática. El modelo celular más utilizado y mejor estudiado es el de las células Madin-Darby canine kidney (MDCK), capaces de reestablecer su polaridad cuando se las siembra sobre un sustrato permeable (Cerejido, Robbins et al. 1978).

## 1.2 El hepatocito y la estructura del lobulillo hepático

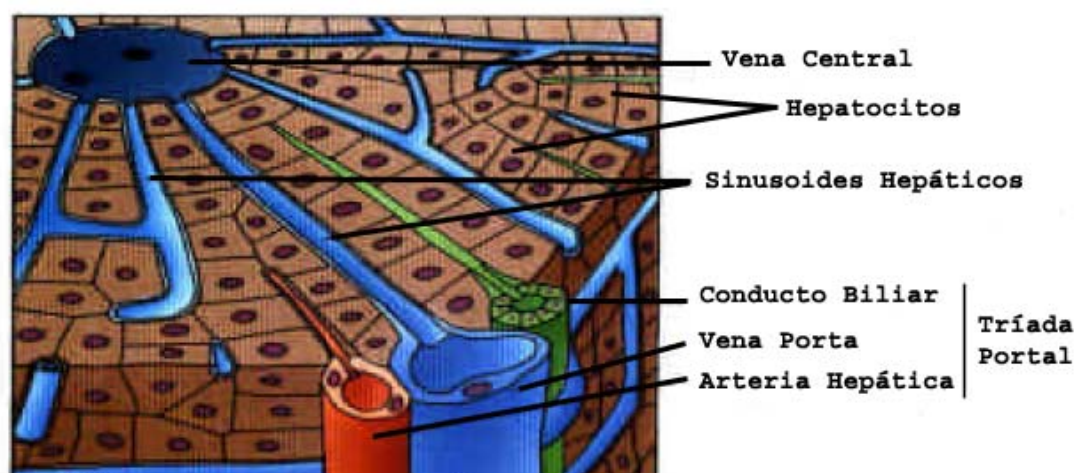
Otra célula polarizada y el principal protagonista de esta tesis es el hepatocito, célula epitelial que constituye la mayor parte de la masa hepática. El hígado es el centro metabólico por excelencia del organismo y recibe las sustancias digeridas y absorbidas en el intestino. Su función principal es la de proporcionar los materiales de los que extraen la energía que necesitan el cerebro, los tejidos musculares y la mayor parte de los órganos periféricos. En él la glucosa es convertida en glucógeno y almacenada como tal, o es utilizada en la síntesis del acetilCoA necesario para la síntesis de ácidos grasos, colesterol y sales biliares; además la oxidación de la glucosa por la vía pentosa-fosfato, genera el NADPH necesario para los procesos reductores implicados en la síntesis de un sinnúmero de moléculas. El hígado, exporta también ácidos grasos y cuando es necesario los oxida y convierte en cuerpos cetónicos. Por último, también utiliza los aminoácidos absorbidos en el intestino para sintetizar proteínas, y en condiciones

<sup>1</sup>. Acrónimo descrito en la página de Abreviaturas



gluconogénicas los convierte en  $\alpha$ -cetoácidos y los emplea en la síntesis de glucosa y ácidos grasos. El hígado es una glándula exocrina y endocrina muy importante. Como glándula endocrina integrada en el sistema gastrointestinal, el hígado produce factores de crecimiento similares a las somatomedinas, que son factores reguladores del eje endocrino que regulan la GH (hormona del crecimiento) y que actúan inhibiendo a la GHIH (hormona liberadora de hormona de crecimiento) secretada por el hipotálamo y estimulando la secreción de somatostatina. Como glándula exocrina, el hígado produce la bilis, necesaria para la emulsión de grasas en el intestino y la eliminación de sustancias tóxicas, entre los que se encuentra el cobre, sujeto principal de esta tesis. Diariamente el hígado produce hasta un litro de bilis, que en su mayor parte, es concentrada unas diez veces en la vesícula biliar antes de ser vertida en el intestino. Este vertido se produce en respuesta a la ingesta de alimentos que la requieren para su digestión y absorción (Ej. grasas).

Respecto a su organización, el hígado es rico en tejido conjuntivo y hepatocitos, que constituyen el 80% de sus células, y le dan un aspecto tan uniforme que dificultan la identificación de su unidad estructural: **el lobulillo hepático**. El lobulillo hepático es la unidad estructural y funcional del hígado, muestra una estructura hexagonal, formada por trabéculas de hepatocitos dispuestas radialmente alrededor de la vena central hepática. En tres de sus ángulos, se disponen el conducto biliar, una rama de la arteria hepática y otra de la vena porta, que cohesionados por tejido conjuntivo, forman la tríada portal o espacio porta. Las ramas laterales de los vasos de la tríada, se prolongan en los sinusoides hepáticos que ocupan los espacios entre las trabéculas radialmente dispuestas de los hepatocitos, que drenan en la vena central (Figura 2).



**Figura 2 | Disposición radial de los hepatocitos y sinusoides alrededor de la vena central. Localización de la tríada portal en uno de los vértices del lobulillo hepático.**

La polaridad del hepatocito es mucho más compleja que la del resto de las células epiteliales, ya que su membrana plasmática está subdividida en varios dominios apicales y basolaterales (Simons and Fuller 1985; Shanks, Cassio et al. 1994). El contacto de los dominios basolateral y apical con la sangre y la bilis, respectivamente, explica que realicen funciones diferentes. Así, mientras que a través de los dominios basolaterales el hepatocito intercambia todo tipo de metabolitos y proteínas con la sangre, a través de los dominios apicales elimina los componentes biliares y con ellos numerosos agentes tóxicos (metales, drogas...)

## **2. El tráfico de proteínas en las células epiteliales.**

### **2.1 La ruta exocítica: ER-Golgi-Membrana Plasmática.**

Las proteínas transportadas a través de la ruta exocítica, son sintetizadas en el retículo endoplasmático y transportadas al aparato de Golgi para su modificación postraduccional. Una vez modificada su destino es diverso ya que mientras unas son almacenadas en la red *trans* del Golgi (TGN), otras prosiguen su camino, siendo distribuidas entre endosomas, lisosomas y membrana plasmática, siendo algunas de ellas, secretadas al medio extracelular.

En las células epiteliales las proteínas de membrana plasmática son distribuidas entre sus dominios apical y basolateral habiendo sido identificadas tres rutas de distribución con origen en la TGN (Figura 3), que son:

1. **Ruta directa:** desde la TGN a los dominios apical o basolateral.
2. **Ruta indirecta:** las proteínas dirigidas al dominio apical son enviadas primero al dominio basolateral, para posteriormente ser transportadas a aquel por transcitosis a través del compartimento subapical (ARE).
3. **Ruta no selectiva:** las proteínas son transportadas a los dominios apical y basolateral de forma aleatoria, y aquellas que pertenecen al otro dominio, son degradadas o transportadas por transcitosis, al dominio correcto.



El transporte a través de una u otra ruta depende tanto de la proteína transportada como del tipo celular (Rodríguez-Boulán and Zurzolo 1993; Matter and Mellman 1994). Así, mientras que en las células MDCK las proteínas son transportadas principalmente a través de la ruta directa, en las células Caco-2 lo son a través de una de las dos vías, directa o indirecta (Rodríguez-Boulán and Powell 1992), mientras que en los hepatocitos, donde funcionan también ambas vías, las proteínas apicales son transportadas alternativamente por la vía directa (Sai, Nies et al. 1999; Kipp and Arias 2000) o por transcitosis, previa parada en el dominio basolateral y en el ARE (Ihrke, Martin et al. 1998).

### **2.1.1 Ruta exocítica apical directa.**

#### ***Señales de transporte apical directo.***

En algunos casos, el transporte de las proteínas apicales hacia la superficie celular depende de la lectura de señales de distinta naturaleza. Las señales implicadas en el transporte de estas proteínas han sido localizadas indistintamente en sus dominios extracelulares, citoplásmicos o transmembrana. La identificación de la primera señal de tráfico apical fue el resultado de observar que algunas de las proteínas localizadas en la superficie apical de las células epiteliales, se unían a la membrana a través de moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Lisanti, Sargiacomo et al. 1988; Brown, Crise et al. 1989).

Por otra parte, estudios realizados en células MDCK tratadas con tunicamicina como inhibidor de la N-glicosilación, permitieron observar que la proteína gp80 deglicosilada perdía su ubicación apical, distribuyéndose aleatoriamente entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática, lo que permitió identificar otro tipo de señales de transporte basadas en la unión de cadenas de N y O-glicanos a los dominios extracelulares de las proteínas de membrana plasmática (Urban, Parczyk et al. 1987; Scheiffele, Peranen et al. 1995). Estas señales, sin embargo, no son universales ya que muchas proteínas son transportadas al dominio apical, independientemente de la presencia o ausencia de cadenas de N-y O-glicanos (Yeaman, Le Gall et al. 1997).

Existe un tercer grupo de señales apicales codificadas por pequeñas secuencias contenidas en la estructura primaria de las proteínas transportadas. En el caso de la hemaglutinina glicosilada del virus de la influenza (HA), las señales de distribución apical están

contenidas en los dominios transmembrana y C-terminal de la proteína (Doyle, Roth et al. 1985), contribuyendo a su integración en los “lipid rafts” que la transportan (Scheiffele, Roth et al. 1997). Por otra parte, en el caso de la rodopsina la señal apical es exclusivamente citoplasmática y participa en el anclaje de la proteína a la cadena ligera de la dineína, LC-Tctex-1, motor microtubular implicado en su transporte al dominio apical (Tai, Chuang et al. 1999). Por último, en otros casos las secuencias de las señales de transporte no han sido todavía caracterizadas (Takeda, Yamazaki et al. 2003).

### ***Los “lipid rafts” como plataformas lipídicas implicadas en el tráfico apical.***

Los “lipid rafts” (o balsas lipídicas), son microdominios de membrana insolubles a 4°C en detergentes no iónicos, ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) o palmitoiladas (Brown and Rose 1992). Se ha postulado que algunas de las proteínas apicales se incorporan a estos microdominios lipídicos como resultado a su afinidad por los glicosfingolípidos y el colesterol que los componen, y que a su vez, el reconocimiento de éstos por maquinarias específicas existentes en la TGN o en los endosomas de reciclamiento resultarían en su incorporación a la ruta apical directa (Simons and Ikonen 1997). Sin embargo, la asociación de las proteínas con los “lipid rafts” no es un requisito indispensable para su transporte apical, ni tampoco los “lipid rafts” son vehículos exclusivamente apicales. Es el caso de las proteínas transmembrana apicales como la enteropeptidasa (Zheng, Lu et al. 1999), la gp114 (Verkade, Harder et al. 2000) y la H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa que alcanzan el dominio apical sin integrarse en los “lipid rafts” (Dunbar, Aronson et al. 2000). Por otra parte, la proteína PrP(C) es transportada al dominio basolateral de las células epiteliales a pesar de su asociación con los “lipid rafts”, lo que indica que algunos de éstos falta por determinar su naturaleza, tienen un destino basolateral (Sarnataro, Paladino et al. 2002; Paladino, Sarnataro et al. 2004).

En cuanto a los receptores que reconocen los “rafts lipídicos”, se ha descrito que la proteína VIP/MAL presente en los microdominios lipídicos es necesaria para la liberación de las proteínas conjugadas a GPI en el dominio apical de las células epiteliales (Cheong, Zacchetti et al. 1999; Puertollano, Martin-Belmonte et al. 1999; Martin-Belmonte, Puertollano et al. 2000). Además de las MAL, las galectinas, una familia de lectinas contenidas en los “lipid rafts” y que interaccionan fuertemente con los glicosfingolípidos presentes en ellos, han sido también implicadas en el tráfico apical de proteínas, habiéndose descrito que mientras que la Galectina-4 está implicada en la organización de los “lipid rafts” (Danielsen and van Deurs 1997), la Galectina-3 que interacciona directamente con las proteínas apicales LPH, p75NTR y gp114 (Delacour, Cramm-Behrens et al. 2006)..

## 2.1.2 Ruta exocítica basolateral directa.

### *Señales de transporte basolateral.*

Las señales implicadas en la distribución de proteínas con destino a la membrana basolateral, están contenidas en su estructura primaria y en concreto en los dominios citoplasmáticos de éstas. Consisten principalmente en motivos tirosina y dileucina, próximos a residuos ácidos. Las señales tirosina caracterizadas hasta el momento son del tipo NPxY e YxxΦ (siendo Φ un residuo hidrofóbico y x un aminoácido cualquiera). Ambas señales son reconocidas por las subunidades μ de los adaptadores de clatrina AP-1 y AP-2 (APs, “adaptor proteins”). El segundo grupo de señales basolaterales, implicado tanto en el transporte de las proteínas al dominio basolateral de la célula, como en su endocitosis y en el transporte a lisosomas, son los motivos dileucina (Sandoval, Martinez-Arca et al. 2000). Existen dos tipos de señales dileucina, las señales [DE]XXXL[LI] y DXXLL reconocidas por las proteínas adaptadoras APs y las GGAs<sup>1</sup>, respectivamente (Dell'Angelica, Puertollano et al. 2000; Puertollano, Aguilar et al. 2001). Un tercer grupo de señales basolaterales descrito recientemente, contiene una única leucina y se desconocen los demás residuos que completan la señal (Wehrle-Haller and Imhof 2001; Deora, Gravotta et al. 2004).

### *Decodificadores de las señales de transporte basolateral: las adaptinas*

Las señales tirosina y dileucina son leídas por las adaptinas. El término adaptina fue acuñado por Barbara Pearse para designar a un grupo de proteínas de aproximadamente 100 kDa que copurificaban con las vesículas cubiertas de clatrina y cuya función es la de concentrar el material transportado en las zonas de membranas cubiertas por clatrina (Pearse 1976). Posteriormente se encontró que las adaptinas formaban parte de cuatro complejos que diferían en la composición de sus subunidades y a los que se llamó adaptadores de clatrina. Se han descrito cuatro clases de adaptadores de clatrina, AP-1, -2, -3 y -4. Cada adaptador está compuesto por dos adaptinas grandes ( $\gamma/\alpha/\delta/\epsilon$  y  $\beta$ 1-4, respectivamente 90-130 kDa), una mediana ( $\mu$ 1-4, ~50 kDa) y otra pequeña ( $\sigma$ 1-4 ~20 kDa) (Boehm and Bonifacino 2001). Los adaptadores son los encargados de unir la clatrina a la membrana (para este paso son importantes las subunidades  $\beta$ ), de seleccionar la carga que será transportada (subunidades  $\gamma$  y  $\beta$ ) y de reclutar las proteínas accesorias que regulan la formación de la vesícula transportadora..

Los estudios realizados hasta el momento, indican que son tres los adaptadores implicados en el tráfico de las proteínas basolaterales, el AP1B (Folsch, Ohno et al. 1999; Gan, McGraw et al. 2002; Sugimoto, Sugahara et al. 2002; Gravotta, Deora et al. 2007), el AP-3 y el AP4 (Dell'Angelica, Mullins et al. 1999; Simmen, Honing et al. 2002; Valencia, Watabe et al.

2006). La subunidad  $\mu 1B$  del AP1B está implicada directamente en el reconocimiento de las señales basolaterales de transporte (Ohno, Tomemori et al. 1999; Gan, McGraw et al. 2002). En las células LLC-PK1, la carencia de la subunidad  $\mu 1B$  hace que los receptores de la transferrina y la LDL sean transportados al dominio apical en vez de seguir la ruta basolateral, es más, la transfección de células LLC-PK1 con la subunidad  $\mu 1B$  restaura su destino basolateral (Eskelinen, Meyer et al. 2002). El adaptador AP4 también ha sido implicado en el tráfico polarizado de los receptores de LDL, transferrina y el receptor manosa -6- fosfato (Simmen, Honing et al. 2002), aunque no se ha caracterizado el orgánulo en el que funciona y no tiene sitios de unión a clatrina, por lo que parece que participa en la formación de túbulos que alcanzan la membrana basolateral (Bonifacino and Lippincott-Schwartz 2003).

### 2.1.3 Ruta indirecta o transcitosis.

La ruta indirecta o transcitosis es la empleada por proteínas, que habiendo sido internalizadas en la superficie apical o basolateral de las células epiteliales, son transportadas al dominio contrario de la membrana plasmática (Rojas and Apodaca 2002). La transcitosis es esencial para mantener la polaridad de la membrana plasmática en las células epiteliales (Bomsel, Prydz et al. 1989).

Las moléculas que siguen esta ruta, atraviesan sucesivamente una serie de compartimentos endosomales. Primero, el material endocitado en la superficie basolateral es retenido en los endosomas basolaterales tempranos (BEE<sup>1</sup>), estructuras vesiculo-tubulares que también reciben el material destinado a la degradación en los lisosomas. A continuación, las proteínas destinadas a ser no degradadas, son transportadas al compartimento subapical (SAC/CRE<sup>1</sup>), donde se mezclan las proteínas endocitadas que proceden del dominio apical y basolateral. El SAC está formado por endosomas tubulares orientados a lo largo del eje ápico-basolateral y contiene tanto proteínas transportadas por endocitosis (por ejemplo, la IgA y su receptor polimérico pIgR) como proteínas que se reciclan (por ejemplo la transferrina y su receptor TfR). El SAC no contiene, por lo tanto, material destinado a ser degradado. Finalmente, las proteínas transcitóticas son transportadas al endosoma de reciclamiento apical (ARE<sup>1</sup>), compartimento que contiene también proteínas apicales que son recicladas rápidamente al dominio apical tras su endocitosis. El ARE, formado por elementos tubulovesiculares y con un pH de 6,5, cubre la última etapa de la transcitosis, que finaliza con las proteínas alcanzando la superficie apical. Cabe destacar que mientras el pH del BEE y del SAC es ácido, de 5.8, el pH del ARE es más alto, 6.5, este hecho proporciona una fuerte evidencia de que son compartimentos distintos.

<sup>1</sup>. Acrónimo descrito en la página de Abreviaturas

En resumen, en las células polarizadas, el SAC funciona como un compartimento donde confluyen las rutas de endocitosis apical y basolateral, y parece claro que dispone de maquinarias de segregación y transporte de proteínas y lípidos muy precisas para enviar a las proteínas a uno u otro destino. Además, debido a su localización central, se puede adaptar rápidamente a situaciones, donde exista un requerimiento eficiente de transporte de determinados componentes hacia la membrana plasmática. Cabe reseñar que las células polarizadas no son las únicas que emplean la maquinaria del SAC, ya que en fibroblastos, las moléculas recicladas del receptor de la Tf, se concentran en una estructura tubular estrecha en la zona pericentriolar, formada probablemente por endosomas de reciclamiento perinuclear o por el equivalente del SAC en células no polarizadas: el compartimento de reciclamiento pericentriolar (PCRC) (Hopkins, Gibson et al. 1994).

Existen evidencias experimentales que sugieren que el SAC y el PCRC están íntimamente relacionados, ya sea a nivel de los mecanismos que median el tráfico de los lípidos y las proteínas, o por la heterogeneidad de ambos compartimentos respecto a su composición bioquímica, así como propiedades de transporte de iones y valores del pH. Se ha visto, que a 18° C el complejo pIgR-IgA y los esfingolípidos, se acumulan en el SAC de células HepG2 polarizadas y en el PCRC de fibroblastos no polarizados (Hopkins, Gibson et al. 1994). Además, las proteínas Rab17 y Rab11 asociadas al SAC, se acumulan en el PCRC de las células no polarizadas. (Ullrich, Reinsch et al. 1996; Ren, Xu et al. 1998). Todas estas evidencias unidas a su muy semejante composición bioquímica, sugieren la existencia de una equivalencia funcional entre el SAC y el PCRC, apoyando la idea de que el segundo sea un precursor del primero.

Una cuestión aún sin resolver es determinar la relación del SAC con el compartimento de reciclamiento endosomal (ARE) (Apodaca, Katz et al. 1994; Barroso and Sztul 1994). Así, se ha propuesto que el SAC está constituido por varios subcompartimentos especializados en los distintos pasos implicados en el tráfico polarizado, y que el ARE podría ser entre ellos, el compartimento implicado en las rutas apicales (Gibson, Futter et al. 1998).

### **3. La ruta endocítica en las células epiteliales**

La endocitosis es el mecanismo que la célula emplea para internalizar materiales y de renovar regiones la membrana plasmática. La forma de endocitosis mejor estudiada es la mediada por cubiertas de clatrina y el adaptador AP-2 (Griffiths and Simons 1986; Mukherjee, Ghosh et al. 1997). Existen además, otras formas de endocitosis que son independientes de



clatrina, como es la endocitosis por caveolas, en la que el elemento estructural fundamental son las caveolinas (Parton, Joggerst et al. 1994). Además de la endocitosis, la célula utiliza la micro- y macropinocitosis para internalizar pequeñas y grandes cantidades de fluidos, y la fagocitosis para internalizar partículas de gran tamaño.

En las células polarizadas existe un factor de complejidad añadido a la endocitosis en las células no polarizadas, ya que en ellas la endocitosis ocurre tanto en el dominio apical como en el basolateral (Bomse, Prydz et al. 1989). Las proteínas endocitadas en el dominio basolateral atraviesan los endosomas basolaterales tempranos (BEE) y el SAC antes de alcanzar el ARE. Las proteínas endocitadas en la superficie apical, entran primero en los endosomas apicales tempranos (AEE) (Leung, Ruiz et al. 2000), para posteriormente dirigirse al SAC y/o al ARE. En el tráfico a través del SAC se ha implicado a la GTPasa reguladora del tráfico vesicular, Rab17, y en el del ARE, a las Rab11 y -25 (Hunziker and Peters 1998; Zacchi, Stenmark et al. 1998; Casanova, Wang et al. 1999).

## **4. El metabolismo del cobre.**

### **4.1 El cobre como elemento esencial y tóxico para los organismos vivos.**

El cobre, el vigésimo noveno elemento de la tabla periódica, es un metal pesado de transición esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos uni y pluricelulares.

El cobre existe en cuatro estados de oxidación,  $\text{Cu}^0$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{3+}$ . Su importancia biológica radica en su capacidad de mostrarse en los estados  $\text{Cu}^+$  (reducido) y  $\text{Cu}^{2+}$  (oxidado). Un gran número de proteínas enzimáticas y estructurales, lo requieren en uno u otro estado para realizar su función. Así, juega un papel esencial actuando como intermediario en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial por la citocromo C oxidasa; en la protección frente a los radicales libres por la  $\text{Cu}^+/\text{Zn}^{2+}$  superóxido dismutasa; en el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina por la lisil oxidasa; en la síntesis del pigmento melanina por la tirosinasa (Petrus, Strausak et al. 2000), y en la síntesis de catecolaminas por la dopamina-  $\beta$ - hidrolasa.

A pesar de ser esencial, el cobre es altamente tóxico pues en su estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ), participa en reacciones en las que se producen radicales hidroxilo libres ( $\text{OH}^\bullet$ ), además del

anión superóxido ( $O_2^{2-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Halliwell and Gutteridge 1984). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) atacan las biomembranas a través del proceso conocido como peroxidación lipídica, desestabilizando su estructura y afectando como resultado la función celular. Además, se ha propuesto que las ROS pueden oxidar directamente a las proteínas y desnaturalizar el DNA y RNA, lo que resulta en el desarrollo de mutaciones que contribuyen al desarrollo del cáncer, enfermedades neurodegenerativas y al envejecimiento celular (Halliwell and Gutteridge 1990). El  $Cu^{2+}$  también actúa desplazando otros metales de sus ligandos. Es particularmente importante el desplazamiento del  $Zn^{2+}$  contenido en los llamados dedos de zinc de proteínas reguladoras que se unen al DNA, de receptores y de proteínas señalizadoras, lo que interfiere en la expresión de determinados genes y en la transducción de señales (Predki and Sarkar 1992).

Debido a la dualidad del cobre como elemento esencial y tóxico, existen tanto en los metazoos como en los organismos unicelulares, mecanismos detoxificadores específicos que impiden su acumulación por encima de niveles fisiológicos. La homeostasis del cobre implica pues, la consecución de un balance perfecto entre su captación, distribución y eliminación. Es dentro de su homeostasis, donde funcionan los tres transportadores de cobre, conocidos como Ctr1, ATP7A y ATP7B, los dos últimos responsables de dos desórdenes genéticos muy graves, del metabolismo de cobre, conocidos como las enfermedades de Menkes y Wilson, respectivamente (Mercer, Livingston et al. 1993; Vulpe, Levinson et al. 1993; Yamaguchi, Heiny et al. 1993).

#### **4.2 Mecanismos de captación, distribución y eliminación del cobre en la célula.**

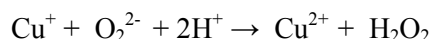
Tras una primera etapa que implica la reducción del cobre en la membrana plasmática, la entrada del  $Cu^+$  en la células se realiza a través del transportador Ctr1 ( $K_m$  para el  $Cu^+$ ,  $1\mu M$ ) (Zhou and Gitschier 1997). En *Saccharomyces cerevisiae*, la reducción de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$  necesaria para su transporte, la realiza la proteína reductasa, FRE1 residente en la membrana plasmática (Hassett and Kosman 1995). En mamíferos todavía no se sabe exactamente cómo ocurre. El transportador Ctr1, muestra un alto grado de conservación evolutiva desde levaduras hasta humanos. El hCtr1 humano es una proteína ubicua de 44,4 kD, altamente glicosilada, con tres dominios transmembrana, que se ensambla en homotrímeros, formando así poros en la membrana (Lee, Pena et al. 2002; Guo, Smith et al. 2004). En la captura y transferencia del  $Cu^+$  por Ctr1, participan 1 o más motivos Met (MXXM, MXM) localizados en su extremo N-terminal y en el segundo dominio transmembrana (Jiang, Nadas et al. 2005). El transporte de

$\text{Cu}^+$  mediado por Ctr1, no requiere ATP, es saturable, muestra un curso temporal típico (Lee, Pena et al. 2002) y es facilitado por la ausencia de iones  $\text{Cu}^+$  en el medio intracelular. Se sabe que Ctr1 se recicla constitutivamente entre la membrana plasmática y los endosomas. Su endocitosis es dependiente de clatrina y tanto ella como su degradación en los lisosomas, es estimulada rápidamente por concentraciones de cobre cercanas a la  $K_m$  de Ctr1, lo que proporciona un mecanismo rápido de regulación de la captación del cobre ingerido en la dieta (Guo, Smith et al. 2004). Una vez dentro de la célula, el  $\text{Cu}^+$  es distribuido entre las cuproenzimas y proteínas estructurales que lo necesitan. La distribución corre a cargo de chaperonas específicas, por 3 vías con destinos distintos: La chaperona CCS cede el cobre a la Cu/Zn superóxido C dismutasa; las chaperonas COX17 y COX11 abren las vías que conducen a los centros  $\text{Cu}_A$  y  $\text{Cu}_B$  de la citocromo C oxidasa mitocondrial, y la ATOX-1 cede el cobre a los transportadores ATP7A y ATP7B que facilitan su paso a través de las membranas del Golgi y la membrana plasmática (Klomp, Lin et al. 1997; Wernimont, Huffman et al. 2000).

En condiciones fisiológicas no existen iones de cobre ( $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) libres en la célula. Cualquier exceso es neutralizado por las metalotieninas (MT), que son proteínas de 62 aminoácidos con un 30% de cisteínas, cuya función es la de secuestrar los metales que quedarían libres ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) contribuyendo con ello a su almacenamiento y a la detoxificación celular. El glutatión reducido (GSH) juega un papel importante en la transferencia de los metales. Así, se ha propuesto que el  $\text{Cu}^+$  tras su entrada en la célula, puede ser rápidamente acomplexado con GSH y después transferido a las MT (Freedman, Ciriolo et al. 1989; Freedman and Peisach 1989). A continuación, se describe en detalle la distribución de cobre celular por las distintas chaperonas (Figura 4).

**1. Vía CCS - Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1).** Como ya hemos indicado anteriormente, en mamíferos la chaperona CCS de 29kD es la encargada de ceder el  $\text{Cu}^+$  a la SOD1. La CCS tiene 3 dominios altamente conservados: un dominio I homólogo al N-Atox1 con un motivo MXCXXC que une el  $\text{Cu}^+$ , un dominio II homólogo a la SOD1, necesario para interaccionar con esta, y finalmente un dominio III, carboxilo terminal con el motivo CXC implicado en la transferencia de  $\text{Cu}^+$  a la SOD1 (Caruano-Yzermans, Bartnikas et al. 2006). Esta transferencia de  $\text{Cu}^+$ , implica la interacción física entre la CCS y la SOD1, formándose previamente un racimo de iones  $\text{Cu}^+$  como resultado de la trimerización de la chaperona CCS (Casareno, Waggoner et al. 1998; Culotta 2000; Wong, Waggoner et al. 2000). La localización de la SOD1 en el citosol, núcleo y espacio intermembranal de la mitocondria, refleja la importancia de su actividad protectora para la célula, actividad que realiza a través de la

catálisis y dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que resulta primero en la producción de  $O_2$ , seguido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Falconi, Iovino et al. 1999).

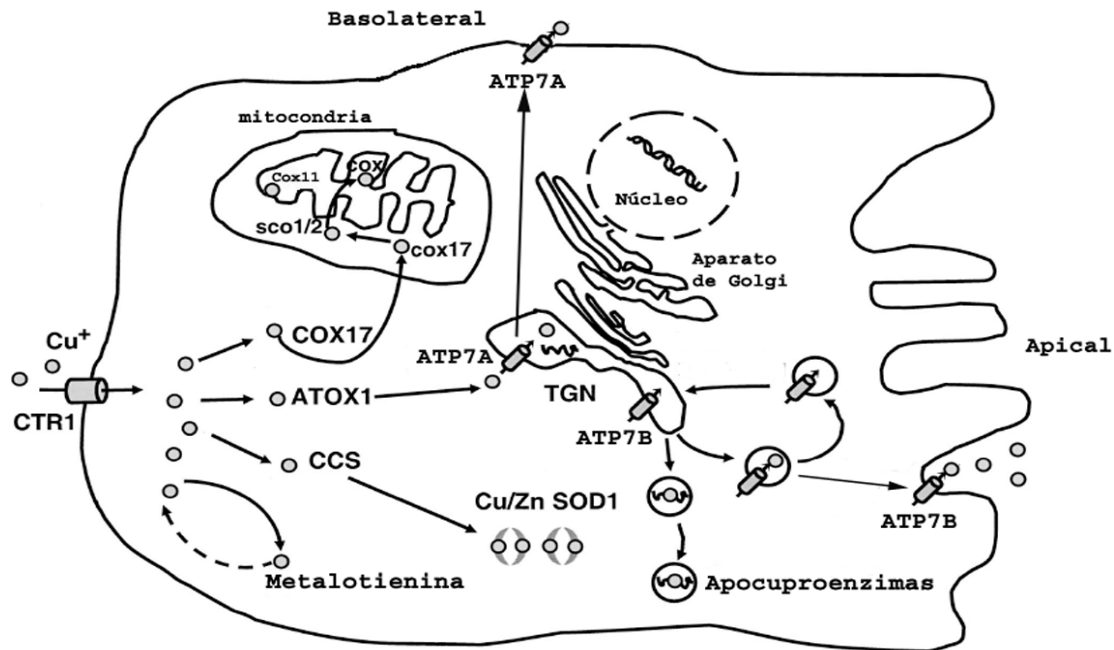


**2. Vía COX17/COX11 - citocromo C oxidasa (COX 1).** La COX1 es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna, formada por 13 subunidades. Funciona en la mitocondria como una oxidasa terminal en la cadena transportadora de electrones, creando el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP (Michel, Behr et al. 1998). Contiene cuatro grupos prostéticos: un grupo hemoA, un hemo A3, un centro diatómico  $Cu_A$  en la subunidad I y un sitio de unión a cobre,  $Cu_B$  en la subunidad II. Los sitios  $Cu_A$  y  $Cu_B$  unen 4 y 2  $Cu^+$  respectivamente. En la adquisición de  $Cu^+$  desde el citoplasma, y en su incorporación a los dos centros de cobre de COX ( $Cu_A$ ,  $Cu_B$ ), participan 4 proteínas: por una parte la Cox17 y las Sco1, Sco2; y por la otra la Cox11. Cox17 es una proteína citoplasmática de 8 kD rica en residuos Cys, necesaria para la formación del complejo citocromo c oxidasa funcional (Glerum, Shtanko et al. 1996), une  $Cu^+$  con gran afinidad (procedente del “pool” unido a GSH) a través de su motivo CCXC (Palumaa, Kangur et al. 2004). Sco1 y Sco2, de 33kD y 35kD respectivamente, están insertadas en la membrana mitocondrial interna con su dominio N-terminal orientado hacia la matriz mitocondrial y el C-terminal al espacio intermembrana. Cox17 transfiere el  $Cu^{2+}$  a Sco1 (Horng, Cobine et al. 2004) y Sco1 y Sco2 cooperan en la inserción del ión en los centros  $Cu_A$  de la subunidad Cox II (Leary, Kaufman et al. 2004). El suministro de cobre al centro  $Cu_B$  se lleva a cabo por la ruta Cox17/Cox11. Cox 11 es una chaperona de 28kD, insertada en la membrana mitocondrial interna con la misma polaridad que las Sco1 y 2. El  $Cu^+$  se une a la Cox11 a través de 3 Cys conservadas, y su dominio C-terminal forma un dímero que coordina un único  $Cu^+$  por monómero (Carr, George et al. 2002).

**3. Vía Atox1-ATP7A/ATP7B.** La chaperona Atox1 (también llamada HAH1) cede el  $Cu^+$  tomado del Ctr1, a los transportadores de cobre ATP7A y ATP7B, pertenecientes a la familia de ATPasas de tipo P. Ambas proteínas tienen la función dual de: a) localizadas en la TGN, suministrar el cobre que necesitan cuproenzimas, como la tirosinasa y la ceruloplasmina, que tras ser sintetizadas son transportadas a través de la vía secretora; b) bombear el cobre fuera de la células a través de la membrana plasmática.

Atox1 es una proteína soluble de 68 aa, con un único sitio de unión a cobre (MxCxxC), similar a los sitios de unión de cobre (MBDs<sup>1</sup>) existentes en el extremo N-terminal de ATP7A y ATP7B. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que Atox1, transfiere el  $Cu^+$  directamente al extremo N-terminal de ATP7B, en concreto al MBD2 con el que interacciona (Walker,

Huster et al. 2004) y a los MBDs 4-6 de ATP7A (Banci, Bertini et al. 2005; Banci, Bertini et al. 2005). La interacción física, dependiente de cobre, del extremo C-terminal de Atox1 con el dominio amino de ATP7A y ATP7B, se ha demostrado mediante ensayos de doble híbrido realizados en levaduras (Larin, Mekios et al. 1999).

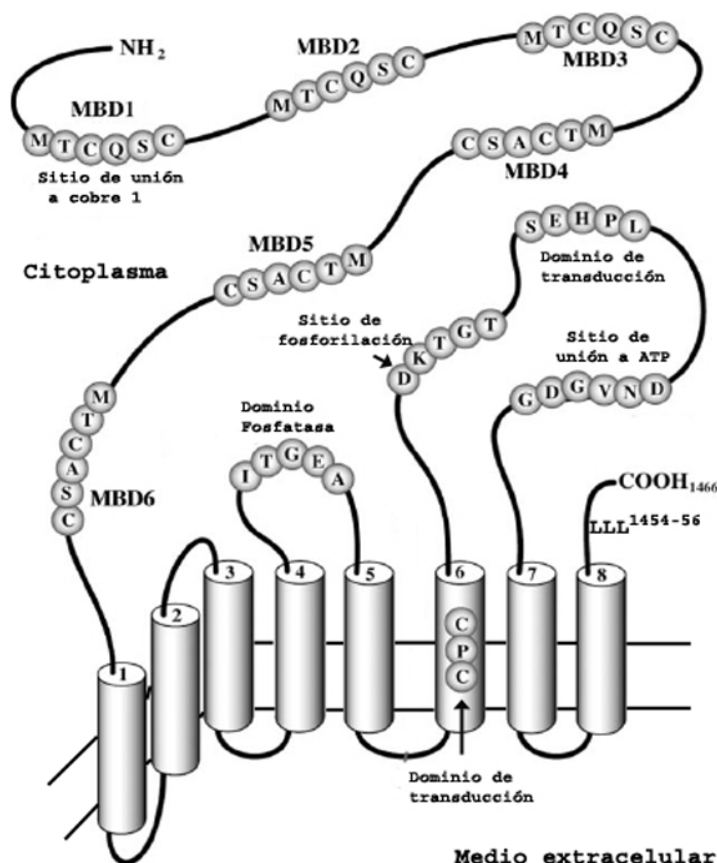


**Figura 4 | Distribución de cobre en la célula.** Con fines didácticos se muestra una célula en la que se expresan y funcionan ATP7B y ATP7A. La entrada de cobre en la célula es facilitada por el transportador CTR1 que lo cede a las chaperonas ATOX1, CCS, COX17 que a su vez lo transfieren a los transportadores de cobre ATP7A/ATP7B, a la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa y a través de Sco1-2 o directamente a los sitios  $\text{Cu}_A$  y  $\text{Cu}_B$  de la citocromo C oxidasa, respectivamente. Cuando las concentraciones de cobre intracelulares son bajas, el ATP7A y ATP7B son retenidas en la red *trans* del Golgi (TGN) donde proporcionan el cobre a las apocuproenzimas que han sido sintetizadas como la tirosinasa y la ceruloplasmina. Cuando los niveles de cobre son altos, ambos transportadores de cobre son translocados a la superficie celular. En células polarizadas ATP7A es transportado a la membrana plasmática basolateral mientras que se discute si ATP7B es transportado a un compartimento vesicular donde el cobre queda secuestrado para posteriormente excretarse sin necesidad del transportador o es translocado a la superficie apical. Cuando la concentración celular de cobre se normaliza, ambos transportadores son reciclados a la TGN. Figura modificada de la presentada en (Hamza and Gitlin 2002).

A continuación describo en detalle la estructura, regulación, función y distribución de ATP7A y ATP7B.

#### **4.3 Los transportadores de cobre ATP7A y ATP7B: propiedades estructurales y funcionales.**

Los genes codificadores de los transportadores de cobre, cuya disfunción resulta en las enfermedades de Menkes y Wilson fueron identificados en los años 1993 y 1994 y denominados *ATP7A* y *ATP7B*, respectivamente (Bull, Thomas et al. 1993; Chelly and Monaco 1993; Chelly, Tumer et al. 1993; Mercer, Livingston et al. 1993; Vulpe, Levinson et al. 1993; Yamaguchi, Heiny et al. 1993). El *ATP7A* ha sido localizado en la región Xq13 del cromosoma X en humanos, se organiza en 23 exones que codifican una proteína de 1500 aa, expresándose el transcrito y la proteína en todos los tejidos excepto en el hígado (Chelly, Tumer et al. 1993; Mercer, Livingston et al. 1993; Vulpe, Levinson et al. 1993). El *ATP7B* se localiza en el cromosoma 13 (Petrukhin, Fischer et al. 1993; Tanzi, Petrukhin et al. 1993; Petrukhin, Lutsenko et al. 1994) contiene 21 exones y su transcrito codifica una proteína de 1465 aa que se expresa principalmente en hígado, cerebro, riñón, glándula mamaria y placenta (Yamaguchi, Heiny et al. 1993). ATP7A y ATP7B son proteínas con ocho dominios transmembrana. La homología entre sus secuencias es del 54%, siendo de un 65% entre sus extremos aminos implicados en la unión de iones  $\text{Cu}^+$ . Como proteínas pertenecientes a la familia de ATPasas de tipo P, ATP7A y ATP7B emplean la energía procedente de la hidrólisis del ATP para translocar el cobre ( $\text{Cu}^+$ ) a través de las membranas celulares (Lutsenko and Kaplan 1995; Scarborough 1999). La familia de ATPasas de tipo P está formada por más de 200 miembros, con representantes en todos los organismos vivos (Palmgren and Axelsen 1998). Es característico de esta familia, el acoplamiento entre su fosforilación cíclica y su función transportadora, fosforilación que resulta de la transferencia del fosfato- $\gamma$  del ATP, al residuo aspártico del motivo DKTG localizado en el dominio P (Carafoli 1992). Los transportadores ATP7A y ATP7B presentan una serie de motivos localizados en dos de sus tres bucles citosólicos, implicados en la unión e hidrólisis del ATP, así como en los cambios conformacionales que acompañan a estos procesos. Así, los motivos TGEA, DKTG y TGDN están implicados en su defosforilación, fosforilación y unión de ATP respectivamente; existiendo además una secuencia conservada, MXGDGXNDXP, que conecta el dominio TGDN al segmento transmembrana (Terada, Schilsky et al. 1998) (figura 5).



**Figura 5 | Estructura y topología del transportador de cobre ATP7B.** En dominio N-citoplasmático contiene los sitios de unión a cobre (MBD1-6), en los que los residuos C (Cys) participan en la coordinación de iones  $\text{Cu}^+$ . En el dominio C- citoplasmático, se localiza la señal trileucina (LLL), implicada en la su retención intracelular y endocitosis. Las secuencias **DKTGT**, **ITGEA**, y **GDGVND** **corresponden** a los motivos fosforilación, fosfatasa y unión de ATP, respectivamente. **CPC** y **SEHPL** son secuencias conservadas en las ATPasas de tipo P implicadas en el transporte de metales y juegan un papel esencial en éste. Figura adaptada de (Wernimont, Yatsunyk et al. 2004).

A pesar de su elevada analogía estructural, existen diferencias entre ambos transportadores. ATP7A tiene una masa molecular de 180 kD y, a diferencia de ATP7B cuya masa molecular es de 160kD, se glicosila en el aparato de Golgi (Yamaguchi, Heiny et al. 1996). Además ATP7A tiene de 30 a 40 residuos adicionales, derivados de la presencia de dos insertos, uno en el primer bucle extracelular donde reside el sitio consenso de glicosilación, y otro en el tercer bucle citosólico.

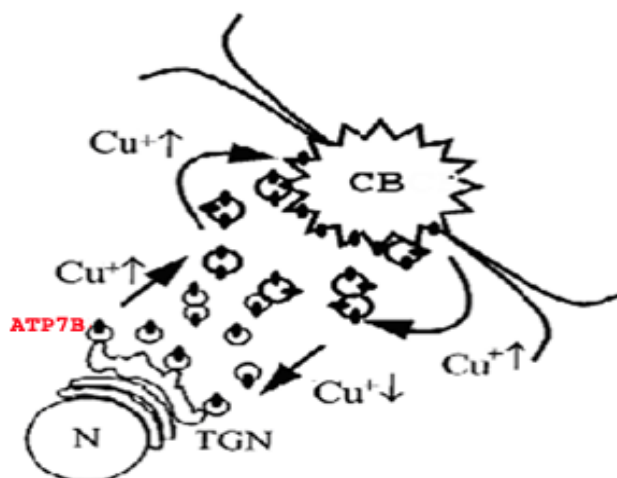
ATP7A y ATP7B poseen 6 dominios de unión a cobre (MBD) en su extremo N- citoplasmático, cuya secuencia consenso es GMTCCXXC. Aunque no todos ellos parecen tener la misma importancia en el proceso de transporte, todos ellos unen un átomo de  $\text{Cu}^+$ ,

(Lutsenko, Petrukhin et al. 1997). Estudios con mutantes producidos por mutagénesis dirigida han demostrado que no todos los MBDs son funcionalmente equivalentes, y que son los dominios 2 y 6, los implicados respectivamente, en la interacción con Atox1 y en la transferencia del  $\text{Cu}^+$  aceptado (Hamza, Schaefer et al. 1999; Walker, Huster et al. 2004). También se ha observado que el  $\text{Cu}^+$  unido a los dominios 5 y 6, estabiliza una conformación que favorece la unión de  $\text{Cu}^+$  a la secuencia CPC en el segmento transmembrana 6, que junto con la secuencia SEHPL interviene en la translocación de cobre a través de la membrana. Por otra parte, el dominio carboxilo terminal juega también un papel importante en el transporte de ambas proteínas, en él reside la señal dileucina de ATP7A ( $\text{LL}^{1487-1489}$ ) y la trileucina de ATP7B ( $\text{LLL}^{1454-1456}$ ), señales implicadas en la retención de ambas proteínas en la TGN y en su reciclamiento a ésta, una vez han sido endocitadas (La Fontaine, Firth et al. 1998; Francis, Jones et al. 1999; Cater, La Fontaine et al. 2006).

Cuando la concentración de cobre intracelular aumenta (20-40 $\mu\text{M}$ ), los transportadores ATP7A y ATP7B son translocados fuera del Golgi y se dirigen a la membrana plasmática para bombear el cobre fuera de la célula. La eliminación de cobre, no implica la síntesis de nuevas moléculas de ATP7A y ATP7B, ya que el proceso de translocación es reversible. Así, mientras que ambas proteínas vuelven a la TGN cuando los niveles de cobre regresan al estado basal, son translocadas de nuevo a la membrana plasmática cuando los niveles del metal vuelven a aumentar.

Existe una fuerte controversia en torno al destino final del ATP7B liberado del Golgi. Mientras que estudios realizados en líneas celulares hepáticas, muestran que el ATP7B es translocado desde la TGN hasta vesículas intracelulares y no alcanza la membrana celular (Hung, Suzuki et al. 1997; Schaefer, Hopkins et al. 1999), otros estudios realizados en células HepG2, han mostrado que ATP7B es transportado a la membrana de canalículo biliar (Roelofsen, Wolters et al. 2000) (Figura 6). Por otra parte, en líneas celulares no hepáticas, en concreto en células CHO, se ha descrito que ATP7B es translocado a un compartimento vesicular, que no contiene marcadores de endosomas tardíos o lisosomas y que por lo tanto, podrían ser endosomas de reciclamiento (Forbes and Cox 2000). Hasta el día de hoy, ha prevalecido el punto de vista de que ATP7B no alcanza el dominio apical del hepatocito y que por lo tanto, el cobre es vertido a la bilis por un proceso de exocitosis a cargo de los lisosomas cargados con el metal. Uno de los objetivos principales de esta Tesis ha sido tratar de aclarar este punto.





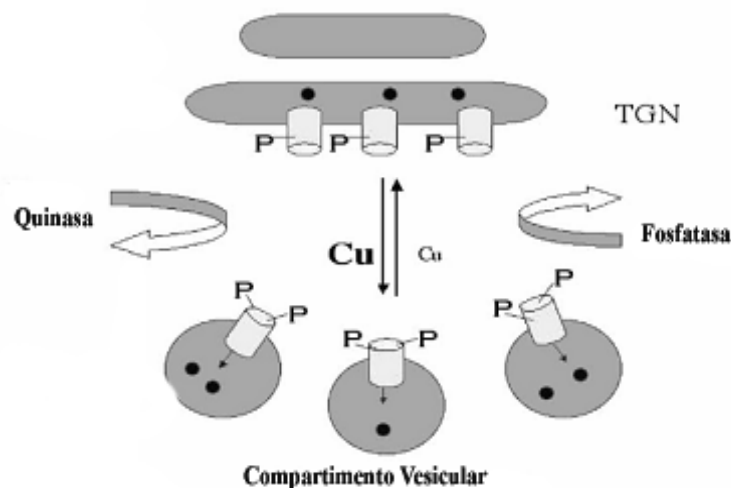
**Figura 6. Tráfico apical del ATP7B en el hepatocito.** El modelo asume la llegada de ATP7B a la membrana del canalículo biliar (CB) cuando las concentraciones de cobre intracelular son elevadas, y sugiere la existencia de un reciclamiento del transportador entre la membrana apical y un compartimento vesicular en su vía de vuelta al Golgi (TGN). N, núcleo. Figura adaptada de (Roelofsen, Wolters et al. 2000).

#### 4.4 Regulación de ATP7B, dependiente de cobre.

De los estudios realizados principalmente por el grupo de Lutsenko, Camakaris y Mercer puede deducirse que el cobre, tras unirse a su transportador, induce en éste una serie de modificaciones pos-traduccionales en ATP7B, entre las cuales la más importante es la fosforilación cíclica, que son esenciales en el control de su distribución celular (Vanderwerf, Cooper et al. 2001; Tsivkovskii, Eisses et al. 2002).

Estudios con mutantes afectados en los procesos de fosforilación y defosforilación, han demostrado que en presencia de niveles bajos de cobre intracelular, ATP7A y ATP7B se encuentran defosforilados y su localización es perinuclear. Por el contrario, al aumentar la concentración celular del metal, éste induciría la fosforilación de la proteína y su translocación a un compartimento vesicular posterior al Golgi, de naturaleza controvertida. Una vez restaurados los niveles celulares de cobre por la acción de los transportadores en la superficie celular, la defosforilación de la proteína ocasionaría su retorno al compartimento perinuclear (Figura 7). Esta observación indicaría que la fosforilación y el tráfico de la proteína son procesos ligados, y

que la fosforilación regulada por cobre podría servir de señal para el tráfico del ATP7B (Vanderwerf, Cooper et al. 2001; Vanderwerf and Lutsenko 2002).



**Figura 7 | Acoplamiento entre estado de fosforilación de ATP7B dependiente de cobre y su translocación vectorial.** A bajas concentraciones de cobre intracelular, el ATP7B (cilindros) es retenido en la TGN y el residuo D del sitio P no está fosforilado. El aumento en los niveles de cobre resultan en la aproximación de los dominios N- y P, la fosforilación del sitio D y la liberación del transportador retenido en la TGN. Al disminuir el cobre, se induce la defosforilación del transportador y su regreso a la TGN. **P:** grupos fosfato añadidos por la(s) quinasa(s). Figura modificada de (Lutsenko and Petris 2003).

#### 4.5 Ingesta y eliminación de cobre en mamíferos.

En los mamíferos, el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) contenido en cereales, carnes, verduras y leguminosas, se absorbe principalmente en el duodeno (Crampton, Matthews et al. 1965; Vancampen and Mitchell 1965). Se ha estimado que en humanos, el cobre ingerido por la dieta oscila entre 1.3 -2 mg/día en adultos, y 0.6-1 mg/día en niños (Linder and Hazegh-Azam 1996). Sólo el 15% del metal ingerido, es retenido por los tejidos, mientras que el 85% restante se excreta en un 98% por la bilis y en un 2% por la orina. El hígado, es el mayor reservorio y distribuidor de cobre a los tejidos y órganos. La absorción de cobre en las microvellosidades de los enterocitos, es facilitada por el Ctr1 que une el  $\text{Cu}^+$  reducido, en su superficie. Es más, la rápida endocitosis del Ctr1 por un mecanismo que implica la unión de  $\text{Cu}^+$  al motivo MXXXM de su segundo dominio transmembrana, y su subsiguiente degradación en los lisosomas, parece jugar un papel importante en la regulación de la absorción del cobre contenido en la dieta (Petris, Smith et al. 2003). No obstante, parece que no todo el cobre absorbido en el intestino lo

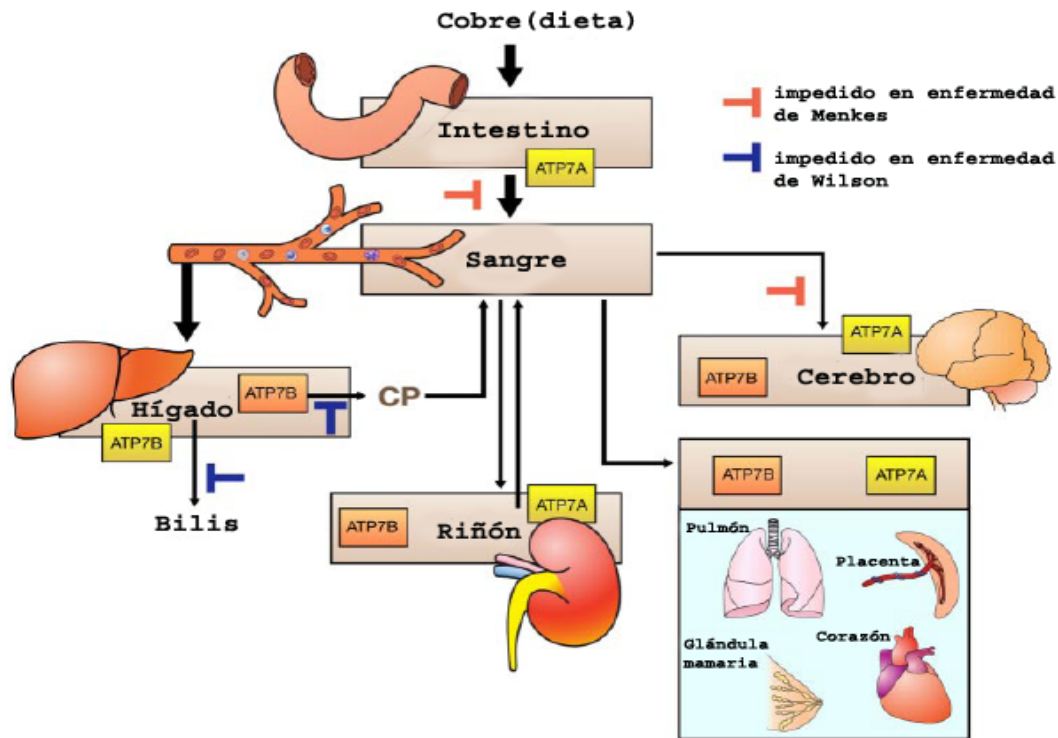
es a través de Ctr1. Existen evidencias experimentales que indican que una parte importante del cobre absorbido, está ligada a la absorción de hierro por el transportador DMT1<sup>1</sup> (Ferruzza, Sambuy et al. 2000). Posteriormente, como ya hemos descrito, el  $\text{Cu}^+$  se acompleja con el glutatión reducido (GSH) antes de unirse a las metalotieninas para ser almacenado en ellas, o a las chaperonas que lo distribuyen a través de las tres vías ya descritas. (Freedman, Ciriolo et al. 1989). En el enterocito, como en las demás células, el ATP7A tiene la función dual ya descrita, pero en él los niveles altos de cobre hacen que predomine su función secretora y el bombeo de  $\text{Cu}^+$  a la circulación (Pase, Voskoboynik et al. 2004). Sin embargo, entre las cuproenzimas que adquieren  $\text{Cu}^+$  en el Golgi del enterocito destaca la hefaestina, una ferroxidasa multi-cobre homóloga a la ceruloplasmina, que oxida  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  antes de ser captado por la ferroportina para su transporte a la circulación a través de la membrana basolateral (Cousins 1985). El vertido de cobre a la circulación portal, va precedida de la oxidación de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , necesaria para su conjugación a la albúmina, su principal vehículo en la sangre. La captación del cobre por el hepatocito es facilitada por el transportador Ctr1. por otra parte, los mecanismos que operan en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  oxidado unido a la albúmina, son desconocidos. En su distribución dentro de hepatocito están implicadas las chaperonas que abren las 3 vías descritas anteriormente. En el almacenamiento del cobre en el hepatocito, juegan una vez más un papel importante las metalotieninas. Como ATP7B es la única ATPasa de tipo P expresada en el hepatocito, el papel dual de éstas, corre a su cargo. Entre las enzimas que adquieren cobre en los hepatocitos destaca la ceruloplasmina que une 6 átomos de  $\text{Cu}^+$  en la TGN antes de ser secretada a la sangre (Zaitsev, Zaitseva et al. 1999), pero se cree que no está implicada en la distribución de cobre desde el hígado a los tejidos (Miyajima, Nishimura et al. 1987; Harris, Klomp et al. 1998). Esquema simplificado en figura 8.

#### 4.6. Enfermedades de Menkes y Wilson: Aspectos clínicos.

En la especie humana la enfermedad de Wilson, es un desorden autosómico recesivo del metabolismo de cobre que muestra una incidencia de 1:30.000 nacimientos, y que está originado por mutaciones en el gen *ATP7B* que afectan a la función del transportador de cobre en el hígado (Figus, Angius et al. 1995; Thomas, Jensson et al. 1995). La enfermedad se caracteriza por una acumulación excesiva de cobre en el hígado, cerebro y riñón (Harris and Gitlin 1996; Shah, Chernov et al. 1997; Culotta, Lin et al. 1999) que provoca patologías hepáticas como hepatitis crónica y cirrosis (Riordan and Williams 2001) y cuando alcanza concentraciones elevadas en el sistema nervioso central, cuadros neurológicos que pueden ser extremadamente graves (Loudianos and Gitlin 2000). En el diagnóstico de la enfermedad, es importante la aparición de los anillos de Kayser-Fleischer, producidos por la acumulación de cobre en la córnea, los bajos niveles de ceruloplasmina en sangre y los altos niveles de cobre en la orina. Se

han asociado más de 300 mutaciones en el gen de ATP7B con la enfermedad de Wilson. Las mutaciones que explican la mayoría de los casos de la enfermedad de Wilson son la mutación H1069Q/C en Europa y Norte América, y la mutación R778L en el Sudeste Asiático. Aunque el residuo H1069 juega un papel importante en la unión de ATP al N- terminal de ATP7B y su substitución por Q/G, inhibe la afinidad de éste por el ATP, provocando la retención de los mutantes en el retículo endoplasmático y la consiguiente falta de función parecen ser las causantes de la enfermedad. En conjunto, un 60% de las mutaciones afectan a la expresión del transportador o a funciones tan relevantes como la unión del cobre, la fosforilación cíclica, el tráfico intracelular, y en menor grado la interacción física de ATP7B con otras proteínas. La diversidad de las mutaciones, puede explicar la variabilidad en la sintomatología clínica de la enfermedad.

La enfermedad de Menkes, es un desorden recesivo ligado al cromosoma X que provoca una deficiencia de cobre en el organismo, siendo su incidencia de 1:100.000 nacimientos (Danks 1980). El principal defecto del que se deriva la enfermedad es la incapacidad de ATP7A de verter el cobre ingerido con la dieta a la circulación portal a través de la membrana basolateral de los enterocitos. Esta disfunción resulta en la acumulación de cobre en la mucosa intestinal y en una deficiencia generalizada y severa de cobre en los órganos periféricos. Además, el transporte de cobre a través de la barrera hematoencefálica también está impedido, como consecuencia del funcionamiento defectuoso de ATP7A en los plexos coroideos. Por otra parte, los recién nacidos que padecen la enfermedad, muestran síntomas asociados con la deficiencia de cobre, entre los que se incluyen problemas neurológicos, anomalías esqueléticas y vasculares, piel laxa e hipopigmentación, debido a que el transporte de cobre a través de la placenta está seriamente impedido durante el desarrollo fetal (Camakaris, Ackland et al. 1980; Camakaris, Danks et al. 1980; Kaler 1998; Kaler and Tumer 1998). Con frecuencia, la enfermedad es letal dentro de los 3 primeros años de vida. Existen sin embargo, dos variedades alélicas menos severas. La primera, llamada síndrome del cuerno occipital, se caracteriza por la deformación del hueso occipital acompañada de osteoporosis, defectos del tejido conectivo, vasos sanguíneos y piel (Kuivaniemi, Peltonen et al. 1982; Proud, Mussell et al. 1996; Qi and Byers 1998) Proud y col. 1996). La segunda, conocida como enfermedad leve de Menkes es extremadamente rara, cursa y con retrasos en el desarrollo neurológico y ataxia (Procopis, Camakaris et al. 1981; Alvarez de Santos and Moreno 1984; Danks 1988). Se han identificado en el gen *ATP7A* de los afectados por la enfermedad, más de 200 mutaciones, incluyendo pequeñas inserciones, deleciones, mutaciones sin sentido y promotoras de substituciones.



**Figura 8 | Absorción del cobre y distribución hacia los distintos órganos y tejidos.** El cobre procedente de la dieta, tras su reducción ( $\text{Cu}^+$ ) en la superficie de la mucosa intestinal, es absorbido en el duodeno. El transportador Ctr1 facilita su absorción por los enterocitos mientras que ATP7A lo bombea fuera de la célula a la circulación portal. En pacientes que padecen la enfermedad de Menkes, el funcionamiento de ATP7A es inexistente o defectuoso, lo que supone una acumulación de cobre en el epitelio intestinal. Una vez en la sangre, el cobre que ha sido oxidado previamente en la superficie basolateral del enterocito, se une a la albúmina y es transportado hasta el hígado. Nuevamente el cobre entra en el hepatocito a través del Ctr1 y es ATP7B, quien lo cede a la ceruloplasmina (CP). En pacientes que padecen la enfermedad de Wilson y presentan un ATP7B disfuncional, la eliminación por la bilis y su incorporación a la ceruloplasmina se encuentran impedidos, lo que resulta en una acumulación de cobre en el hígado. Figura adaptada de (Lutsenko, Barnes et al. 2007).

## **OBJETIVOS**



Esta tesis surge como parte de un proyecto que estudia los mecanismos moleculares y los compartimentos celulares implicados en el secuestro, transporte y distribución de proteínas homeostáticas que modifican de forma transitoria la membrana plasmática dotándola o privándola de funciones que son claves para la homeostasis de la células y el organismo.

El proyecto empezó con el estudio del transportador de glucosa GLUT4, que en respuesta a la activación del receptor de la insulina es translocado desde un compartimento que forma parte de la red *trans* del aparato de Golgi a la membrana plasmática, facilitando así la entrada de glucosa en la célula. Este compartimento fue llamado P-GSC (acrónimo de Perinuclear GLUT4 Storage Compartment) y parecía tratarse de un orgánulo universal, puesto que en toda célula transfectada con GLUT4, éste era retenido en el mismo compartimento perinuclear yuxtapuesto al Golgi. Fue la observación de que el P-GSC era universal y que dos proteínas, los transportadores de cobre ATP7A y ATP7B, eran retenidas en el Golgi a bajas concentraciones de cobre y lo abandonaban al aumentar los niveles del metal, así como la existencia de señales potenciales de transporte semejantes a las identificadas en GLUT4 lo que nos llevó a marcarnos los siguientes objetivos:

1. Estudiar si ATP7B era translocado a la membrana plasmática (canalículo biliar) en respuesta al aumento en la concentración celular de cobre, ya que los modelos más recientes excluían la membrana plasmática como destino final de la translocación de ATP7B, donde operaría directamente en la excreción de cobre por la bilis.
2. Determinar si los transportadores de cobre, ATP7A y ATP7B eran retenidos en el mismo compartimento que GLUT4.
3. Caracterizar las señales de tráfico responsables de la retención intracelular, translocación y reciclamiento de ATP7B al aparato de Golgi.





## MATERIALES Y MÉTODOS



## **Materiales.**

### **Anticuerpos contra los transportadores de cobre ATP7A y ATP7B.**

Para el estudio del transportador ATP7B se desarrollaron dos anticuerpos policlonales en conejos, uno de ellos contra el extremo N-citoplasmático (aa 1-655) del ATP7B humano (llamado anticuerpo Ab1) y el otro contra 4 péptidos contenidos en la secuencia de ATP7B de ratón (llamado anticuerpo Ab2 4P). Para el estudio del transportador ATP7A se diseñaron 4 péptidos contenidos en las secuencias del ATP7A de humano. Las secuencias de los péptidos escogidas cumplieron el requisito de no ser compartidas entre los dos transportadores de cobre ni con otras proteínas, para lo que se consultó la base de datos *GeneBank* utilizando el programa BLAST.

Para la producción del anticuerpo Ab1 contra ATP7B, se realizó una proteína de fusión entre GST y los primeros 655 aminoácidos del extremo amino de ATP7B, dominio que incluye los 6 dominios de unión a cobre, clonando este segmento en el vector de expresión en bacteria pGEX-6P-1. Para ello, se introdujeron por mutagénesis dirigida dos sitios nuevos de restricción, *BamHI* y *SmaI* en la secuencia de DNA, así como un codón de terminación en la posición () justo antes del primer segmento transmembrana. Este anticuerpo había sido desarrollado previamente por otros grupos para los estudios de tráfico de ATP7B en respuesta a las variaciones de cobre intracelular (Guo, Nyasae et al. 2005; Bartee and Lutsenko 2007). Tanto la construcción como el anticuerpo fueron desarrollados por el Dr Yo Tsuchiya en el laboratorio.

En todos los estudios de microscopia y análisis por Western fueron empleados anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad, bien conjugando los péptidos correspondientes a una columna de *SulfoLink*® (Pierce) conjugando la construcción GST-N-ATP7B a una columna de glutation-sefarosa (BD Biosciences) siguiendo las intrucciones del fabricante.

Los péptidos escogidos para la producción del anticuerpo Ab2 4P fueron los p334-341, p937-951, p1319-1343 y p1395-1427. El anticuerpo fue producido por el Dr. Ignacio Sandoval en el laboratorio. En la Tabla I se muestra sus secuencias y reactividad en el test del *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

TABLA I: PÉPTIDOS EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO AB2 4P CONTRA ATP7B.

<u>PÉPTIDO</u>	<u>SECUENCIA</u>	<u>REACTIVIDAD en el ELISA</u>
p334-341	N-EENEPQSGSSQRHQEQGPGRTC-COOH	-
p937-951	N-QKYFSPSPSKHISQTEC-COOH	+++
p1319-1343	N-DDRRRDSPRATAWDQVSYVSQVSLSC-COOH	+
p1395-1427	N-SLTSDRLSRHGGAEDGGDKWSLLLSDRDEEQC-COOH	++

Los péptidos escogidos para la producción del anticuerpo MNK, anti-ATP7A fueron los p53-70, p139-163, p1411-1432 y p1483-1500. El anticuerpo fue producido por el Dr Ignacio Sandoval en el laboratorio. Las secuencias y reactividad individual de cada uno de los péptidos con el anticuerpo en el test del *ELISA*, se muestran en la tabla II.

TABLA II: PÉPTIDOS EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA ATP7A

<u>PÉPTIDO</u>	<u>SECUENCIA</u>	<u>REACTIVIDAD en el ELISA</u>
p53-70	NH <sub>2</sub> -RASINLLSDKRSLNSVVTSEP-COOH	++
p139-163	NH <sub>2</sub> -KHSLLVGDFREDDDTAL-COOH	+
p1411-1432	NH <sub>2</sub> -KELVPELSLDGTGLEKKSGACEDHS-COOH	+++
p1483-1500	NH <sub>2</sub> -DPKLQTPKTLQEAIIDMG-COOH	++++

### Anticuerpos marcadores de orgánulos y estructuras celulares.

- Anticuerpo anti-gp74 25H8: anticuerpo monoclonal de ratón producido en el laboratorio utilizado como marcador de la red *cis* del aparato de Golgi (CGN) (Alcalde et al. 1994).
- Anticuerpo anti-GMP<sub>c-1</sub> 15C8: anticuerpo monoclonal de ratón producido en el laboratorio utilizado como marcador de las cisternas medias del aparato de Golgi (SGC) (Yuan et al., 1987).
- Anticuerpo anti-GMP<sub>t-1</sub> 18B11, anticuerpo monoclonal de ratón producido en el laboratorio, empleado como marcador de la red *trans* del aparato de Golgi.
- Anticuerpo anti-sintaxina 6, monoclonal de ratón utilizado como marcador de un compartimento posterior al de TGN38 en el Golgi (BD Transduction Laboratories).
- Anticuerpo anti- GLUT4, 1F8 monoclonal de ratón producido contra los 10 últimos aminoácidos del extremo carboxilo del transportador de glucosa regulado por insulina (Biogenesis, UK).
- Anticuerpo anti-Rab11 monoclonal de ratón empleado como marcador del compartimento subapical (BD Transduction Laboratories).
- Anticuerpo anti-MRP2 anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína cMOAT (multi-organic anion transporter) utilizado como marcador de la membrana apical de los canalículos biliares (Chemicon Internacional) (Paulusma, Bosma et al. 1996). Cedido por el Dr Luis Álvarez (Hospital Universitario La Paz, Madrid).
- Anticuerpo anti-HA4 monoclonal de ratón, también marcador de la membrana de los canalículos biliares obtenido del *Hybridoma Bank* de la Universidad de Iowa (Hubbard, Bartles et al. 1985).
- Anticuerpo R26.4C, anticuerpo monoclonal de rata contra la proteína ZO-1 de las *tight junctions* obtenido del *Hybridoma Bank* de la Universidad de Iowa (Stevenson, Siliciano et al. 1986).
- Anticuerpo anti-HA, monoclonal de ratón 16B12 (BAbCO Berk, CA) (Czech, Chawla et al. 1993).

- Anticuerpo anti-acuaporina 9, policlonal AQ9 A-1 (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX).

## Construcciones de DNA y producción de mutantes.

### Obtención del cDNA completo del transportador de cobre ATP7B

El cDNA del transportador de cobre ATP7B fue clonado por la Dra Lalioti en el laboratorio, utilizando para ello una genoteca de hígado de ratón y el sistema *Marathon Ready*<sup>TM</sup> cDNA (Clontech) con los oligonucleótidos GSP1 (5'CAGGGAGCAGGGG CAGGCGATGCACAGCAC-3') y GSP2 (5'GGCTCCCATTTCAGCAGCTGGCTGACCGGT T-3') para amplificar los extremos 5' y 3' respectivamente del cDNA correspondiente a ATP7B. La reacción se llevó a cabo utilizando la DNA polimerasa, *Advantage cDNA Polymerase Mix* (Clontech) y un termociclador *RoboCycler® Gradient 96 Temperature Cycler* (Stratagene) siguiendo las condiciones recomendadas en el uso del sistema *Marathon Ready*<sup>TM</sup> cDNA (Clontech). Se amplificaron así dos fragmentos de 3 y 2.2 kb correspondientes al extremo amino y carboxilo de ATP7B y que fueron extraídos y purificados de geles de agarosa utilizando el sistema *GeneClean* (Bio101, Inc). El clonaje por separado de los dos fragmentos fue llevado a cabo utilizando el vector *pT-Adv* (Clontech) los dos fragmentos del cDNA de la proteína, siguiendo para ello las instrucciones del sistema *AdvanTage PCR Cloning Kit* (Clontech). Finalmente el cDNA completo fue reconstruido por la Dra Olga Madrid, digiriendo los fragmentos de 3 y 2.2 kb con las enzimas *AgeI* y *NotI* clonandolos de nuevo en el sitio *NotI* del vector *pCDNA3.1/ Myc-His B* (5.5kb) (Invitrogen). Todos los experimentos de clonaje de DNA se hicieron siguiendo los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989).

### Producción de mutantes de ATP7B por mutagénesis dirigida.

Los mutantes necesarios para estudiar el tráfico y retención de ATP7B se produjeron por mutagénesis dirigida empleando la enzima *PfuTurbo®* DNA polimerasa (*Stratagene*). Dependiendo del sitio mutado, se utilizaron como molde los extremos amino y carboxilo de ATP7B clonado en el vector *pT-Adv* (Clontech). Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de 45 segundos a 94° C seguido por 18 ciclos de, 45 segundos a 94° C, 70 segundos a 55° C y 120 segundos/kb de longitud de plásmido a 68° C, cada uno.

Los oligonucleótidos diseñados para producir cada uno de los mutantes se muestran en la tabla III.

TABLA III: OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS MUTANTES DE ATP7B POR PCR.

<b>MUTANTE</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDO DISEÑADO 5'→3'</b>
Mutante $\Delta 8$	5' TCCCTGCTCCTGAGT <b>T</b> GACAGGGATGAAGAG
Mutante K <sup>1448</sup> E	5' AGGACGGTGGCGAC <b>G</b> AATGGTCCCTGCTCC
Mutante L <sup>1451</sup> S	5' GCGACAAATGGTCC <b>T</b> CGCTCCTGAGTGACA
Mutante L <sup>1452</sup> S	5' ACAAATGGTCCCTG <b>T</b> CCCTGAGTGACAGGG
Mutante L <sup>1453</sup> S	5' AAATGGTCCCTGCTC <b>T</b> CGAGTGACAGGGAT
Mutante D <sup>1447</sup> R	5' GAGGACGGTGGC <b>C</b> GCAAATGGTCCCTGCTC
Mutante F <sup>493</sup> VQI	5' GCATCACAGAAGTGCT <b>C</b> CGTACAGATCAAAGG

Los cambios introducidos en la secuencia del DNA silvestre para producir las mutaciones, están marcados en azul.

### Introducción del epítipo HA en la secuencia codificadora del tercer bucle extracelular de ATP7B.

Para realizar esta construcción primero se introdujeron por mutagénesis dirigida dos sitios de restricción únicos *ClaI* y *AscI*, flanqueando la secuencia que codifica el tercer bucle exofacial de ATP7B que se extiende entre la G<sup>945</sup> y la F<sup>974</sup>. También se diseñaron dos oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' y complementarios del DNA codificante del epítipo HA con los sitios *AscI* y *ClaI* en sus extremos. La formación del duplex de DNA se



realizó calentando a 95° C la mezcla de ambos oligonucleótidos en el buffer de ligación de la enzima T4 ligasa (*Roche*), posteriormente se dejó enfriar la mezcla hasta 50° C durante 15 minutos y finalmente se dejó durante 8 horas a temperatura ambiente para permitir su hibridación. A continuación se religó con el DNA molde del ATP7B previamente digerido con las enzimas *AscI* y *ClaI*. El producto de ligación fue amplificado en *E. coli* DH5a como se describe en Sambrook y col. (1989).

**TABLA IV: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN LA INTRODUCCIÓN DEL EPÍTOPO HA EN EL TERCER BUCLE EXTRACELULAR DE ATP7B.**

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'→3' DISEÑADA
Oligo Sitio <i>ClaI</i>	5'CATTGGCTTTATCGATTTCGG3'
Oligo Sitio <i>AscI</i>	5'GGCTTTGTTCGATTTCGGCGCGCCTCAGAAGTACTTTCCTAGCC3'
HA oligo directo	5'p- <b>CGATT</b> <u>TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT</u> <b>GG</b> 3'
HA oligo reverso	5'p- <b>CGCGCC</b> <u>AGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA</u> <b>AT</b> 3'

En azul se marcan las mutaciones realizadas para introducir los sitios para las enzimas de restricción *ClaI* y *AscI*. Los nucleótidos subrayados abarcan la secuencia del epítipo HA y en rojo se indican los nucleótidos que hibridan con los sitios de restricción *AscI* y *ClaI*.

## Cultivo Celular.

Siendo el objetivo principal de esta tesis la caracterización de los mecanismo de retención y distribución de ATP7B en el hepatocito así como de los orgánulos y estructuras en ellos implicado, la mayor parte de los estudios realizados con células en cultivo a lo largo de ella han implicado el uso de líneas celulares derivadas del hepatocito, y capaces de polarizarse y utilizar el dominio apical de su membrana plasmática en la formación de canalículos biliares, estructuras a través de la que se excreta y canaliza el cobre eliminado por la bilis. Entre las líneas empleadas con las anteriores propiedades se empleó preferentemente la línea Can10 derivada de las células Fao de hepatoma de rata con capacidad de formar canalículos biliares largos y ramificados y obtenidas gracias a la Dra. Cassio de la Université Paris-Sud (Orsay-France). También se utilizaron, en la mayoría de los casos en experimentos controles, células WIF-B9, HepG2 y Morris. Siendo las células WIF-B9 un híbrido entre hepatocito de rata y fibroblasto humano (Ihrke et al. JCB. 1993. 123, 6 1761-1775) amablemente cedidas por la Dra.

Hubbard del Departamento de Biología Celular de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore), las células HepG2 de hepatoma humano que al igual que las células WIF B9 comparten la capacidad de formar canalículos biliares rudimentarios, y las células Morris de hepatoma de rata sin capacidad de polarizar.

Otras líneas celulares estudiadas han sido: las células MDCK de riñón de perro por su capacidad de polarizarse y formar TJs en las que estudiar la reactividad del anticuerpo Ab2 4P. Entre las células no polarizadas y de origen no hepático utilizadas se encuentran las células NRK de riñón de rata (normal rat kidney), las células COS-7 de riñón de mono verde africano transformadas con el virus SV40 y los fibroblastos establemente transfectados con GLUT4 (Martinez-Arca, Lalioti et al. 2000).

Las células Can10 se sembraron en soporte de plástico (Falcon) o vidrio (Menzel-Grasel) a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/cm<sup>3</sup> en medio F12K suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% glutamax (Gibco), 50g/ml gentamicina, 100g/ml estreptomicina, 100UI/l penicilina y dependiendo del estudio a realizar se dejaron crecer entre 5 o 7 días para que alcanzaran mayor o menor polaridad (Peng, Grosse et al. 2006).

Las células WIF-B, se sembraron en soporte de plástico o vidrio, a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (Ihrke, Neufeld et al. 1993) y se dejaron en cultivo con medio F12K (Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Sigma), 1% glutamax (Gibco), HAT 100X (Sigma), 50g/ml gentamicina, 100g/ml estreptomicina, 100UI/l penicilina durante 14 para que alcanzaran su máxima polaridad.

Las células HepG2 fueron crecidas durante 4 días hasta alcanzar su confluencia en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino, 4mM glutamina, 50g/ml gentamicina, 100g/ml estreptomicina, 100UI/l penicilina y aminoácidos no esenciales. En este mismo medio se cultivaron también las células COS-7 y NRK así como el clon de fibroblastos 3T3-L1 establemente transfectado con GLUT4 con 5μg/ml de puomicina añadido al medio de cultivo.

Para los estudios de respuesta de ATP7B a las variaciones de cobre intracelular, las células se trataron durante 4 horas con DMEM completo suplementado con 200 μmol/L bazocupreína (BCS) (Sigma España, Alcobendas, Madrid) o con 50-200 μmol/L CuCl<sub>2</sub> (Sigma España, Alcobendas, Madrid) durante periodos de entre 2 minutos y 4 horas, dependiendo del estudio a realizar.

Todas las células se incubaron a 37° C en un incubador Forma Scientific, con 97% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>.

### **Experimentos con drogas: Brefeldina A y Ro-090179.**

Las soluciones “stock” de Ro-090179 (Roche) y Brefeldina A (Sigma) se prepararon en DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma) a una concentración de 10 mg/ml (1000x). Las células se incubaron con BFA a distintos tiempos, entre 5 y 90 minutos (Alcalde, Bonay et al. 1992). Las células tratadas con Ro se incubaron con la droga durante 90 minutos (Sandoval and Carrasco 1997).

### **Transfecciones transitorias en células COS-7 y NRK.**

Tanto las células Cos-7 como las NRK se crecieron sobre cubres de cristal 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 80% y se transfectaron de forma transitoria con *LipofectAMINE 2000 Reagent* (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante, incubandose las células con 0,1mM cicloheximida las últimas 3 horas de la transfección con objeto de limpiar la ruta secretora de las proteínas transfectadas. En la mayoría de los casos, las células fueron fijadas para su estudio 18 horas después de la adición de la mezcla de lipofectamina.

### **Microscopía de inmunofluorescencia convencional y confocal.**

Para los estudios de inmunofluorescencia, las distintas líneas celulares fueron crecidas un mínimo de 48 horas sobre cubres de cristal de 10mm de diámetro, en el medio de cultivo apropiado, y posteriormente fijadas con metanol frío (-20° C) durante 3 minutos, o bien con una solución de 3% PFA en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente, con posterior bloqueo de los grupos aldehído libres con 10mM glicina en PBS durante 5 minutos y permeabilización de las células durante 8 minutos con 0,2% Tritón X100 preparado en PBS con 3% BSA. Una vez retirados los medios de fijación y permeabilización y ser lavadas en PBS, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios escogidos durante 1 hora a 37° C, o toda la noche a 4° C, antes de ser lavadas en PBS durante 30 minutos y ser incubadas con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados a fluoróforos. Los anticuerpos secundarios empleados fueron el Alexa Fluor® 488 IgG (Invitrogen), Alexa Fluor® 594 IgG (Invitrogen), Alexa Fluor® 647 IgG (Invitrogen), Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG2a, producidos contra la especie correspondiente al anticuerpo primario. Los cubres con las células inmunoteñidas fueron montados en portaobjetos de vidrio, usando Gervatol (Montsanto) como medio de montaje. Los estudios por microscopía fueron realizados con un microscopio invertido (Axiovert 135M).

Zeiss) y fotografiados con una cámara digital Nikon D70 o con un microscopio confocal Radiance 2000 (BioRad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100TV (Zeiss) con los láseres de argón (480nm) y helio/neón (543nm) y Diodo Rojo 638nm con el iris de apertura óptimo, en el caso de los estudios de microscopía confocal. Los objetivos empleados fueron el de 63X/ 1.4 oil Plan-Apochromat y 100X/1.3 oil Plan Neofluor.

## Inmunohistoquímica.

Las ratas utilizadas en los estudios inmunohistoquímicos de secciones de hígado de rata, fueron machos Wistar-Hannover (Møllegaard Breeding Center, Ll. Skensved, Dinamarca) alimentados con una dieta estándar. Los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano al 3% 5L/min y sus hígados fueron fijados por perfusión a través de la arteria aorta abdominal con una solución de 3% paraformaldehído en 0,1M de cacodilato sódico, pH 7,4. Posteriormente el tejido fue mantenido en la misma solución de fijación antes de ser deshidratado y se embebido en parafina. El tejido paraafinado fue cortado en secciones de 2 µm con un microtomo Leica Microsystems A/S (Herlev, Dinamarca), y posteriormente desparaafinado durante toda la noche con xileno. A continuación fue rehidratado con etanol (10 minutos etanol 100%, 5 minutos etanol 96%, 5 minutos etanol 80%, 5 minutos etanol 70% y 5 minutos agua destilada). Dado que el reactivo utilizado para visualizar la tinción fue el producto de la HRP, la actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol durante 30 minutos. Las secciones fueron hervidas en un horno microondas durante 16 minutos en 10mM Tris pH 9.0 with 0.5mM EGTA para exponer los antígenos y los grupos aldehídos libres bloqueados con 50mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS durante 30 minutos. Posteriormente las secciones titulares fueron lavadas con 1% BSA, 0,05% saponina y 0,2% gelatina preparadas en tampón PBS e incubadas toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en PBS con 0,1% BSA y 0,3% Tritón X-100. Al día siguiente las secciones fueron lavadas con 0,1% BSA, 0,05% saponina y 0,2% gelatina en PBS e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (DAKO) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, una vez lavadas las secciones, la reactividad del anticuerpo fue visulada utilizando 3,3'tetracloro de diaminobencidina (Kem-En-Tek A/S, Copenhagen, Dinamarca) preparado en 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente los tejidos fueron tiñidos con hematoxilina, hidratados con etanol gradual y xileno y montados en un medio hidrofóbico (Eukitt; O. Kindler GmbH, Freiburg, Alemania). Para la tinción con fluoróforos, las secciones de hígado fueron procesadas de manera similar, sin bloquear la peroxidasa endógena y añadiendo un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo. Los portaobjetos se montaron con el medio de montaje Glycagel (DAKO). Los microscopios empleados fueron un Leica DMRE y un confocal Leica TCS-SP2 ( Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania)

## **Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida y Western blot.**

Las proteínas contenidas en las preparaciones de membranas celulares fueron separadas en geles de 8% SDS-poliacrilamida al en condiciones desnaturizantes con SDS y DTT. La electroforesis se llevó a cabo con una fuente de alimentación (Pharmacia) a 12mA durante toda la noche. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Scheleicher & Schuell) durante 7 horas a 90V empleando una fuente BioRad. A continuación las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con una solución de 5% leche desnatada preparada en tampón de lavado (0,1% Tween 20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente antes de ser añadido el anticuerpo primario correspondiente a la dilución apropiada (1/100-1/800) preparado en tampón de lavado con 3% BSA, dejándose incubar a 4° C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las membranas fueron lavadas con tampón de lavado 3 veces durante 10 minutos, e incubadas 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario contra el primario, conjugado a peroxidasa F(ab')<sub>2</sub> (Amersham Int) diluido 1:5000 en 1,5% BSA en tampón 0,1% Tween 20 en PBS. Finalmente las membranas fueron lavadas con tampón 0,1% Tween 20 preparado en PBS y las proteínas detectadas por quimioluminiscencia incubando las membranas durante 2 minutos con agitación y protegidas de la luz, con 10ml de 100mM Tris-HCl pH 8,0, 3µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25µl de ácido cumárico 90mM y 50µl de luminol 250mM.

## **RESULTADOS**



## **I. Distribución del transportador de cobre, ATP7B, en el hepatocito.**

### **1. El compartimento de retención de ATP7B.**

#### **1.1. Antecedentes experimentales.**

Como ya he comentado en la Introducción, los estudios realizados en diferentes laboratorios con objeto de identificar los orgánulos implicados en la retención intracelular de ATP7B, son consistentes en describir que en células tratadas con bazocupreína (BCS) y bajos niveles de cobre, ATP7B colocaliza con proteínas de membrana residentes en la red *trans* del Golgi (TGN) (Roelofsen, Wolters et al. 2000; Huster, Hoppert et al. 2003). Por otra parte, estudios similares realizados con ATP7A, el transportador de cobre expresado en todas las células de mamíferos excepto en el hepatocito, han descrito también su retención en la TGN (Yamaguchi, Heiny et al. 1996; Dierick, Adam et al. 1997).

#### **1.2. El modelo de células Can10 y la obtención del anticuerpo Ab1.**

Con el propósito de que los estudios realizados en células en cultivo reprodujeran lo más fielmente posible lo que sucede en el hepatocito organizado en el lobulillo hepático, escogimos las células Can10, una nueva línea celular derivada de células Fao de hepatoma de rata, que tras polarizarse, forma canalículos biliares largos y ramificados semejantes a los existentes en el hígado (Peng, Grosse et al. 2006). Las células Can10 ofrecen además la ventaja sobre las células WIF-B9 empleadas por otros laboratorios (Ihrke, Neufeld et al. 1993; Shanks, Cassio et al. 1994), de no expresar ATP7A, proteína que por su homología con ATP7B, reacciona con los anticuerpos empleados habitualmente en el estudio de éste.

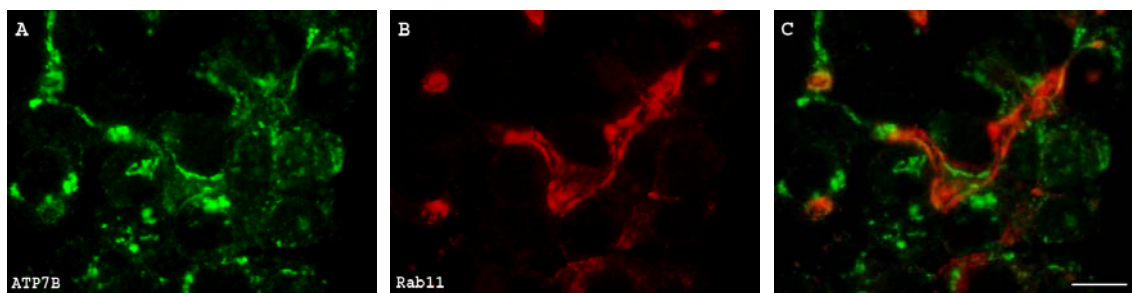
Tras la elección de la línea celular, el siguiente paso fue desarrollar en el laboratorio un anticuerpo con el que estudiar el tráfico de ATP7B dependiente de cobre. Para su obtención se siguió la estrategia utilizada por otros grupos de construir y expresar una proteína recombinante que contenía los primeros 612 aminoácidos del extremo amino de ATP7B fusionados a GST, secuencia que incluía los 6 dominios citoplasmáticos de unión a cobre (Forbes and Cox 2000) (ver Materiales y Métodos). Todos los experimentos que se describen a continuación, fueron realizados con el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad, utilizando para ello la



proteína recombinante unida a una columna de GSH-Sefarosa. Nos referiremos a este anticuerpo con las siglas **Ab1**.

### 1.3 La retención intracelular de ATP7B en células Can10 cultivadas en condiciones fisiológicas.

Para estudiar la retención de ATP7B por microscopía de inmunofluorescencia en células Can10 con largos canalículos biliares, estas fueron crecidas durante 7 días a una densidad de  $2-6 \times 10^3/\text{cm}^2$  utilizando medio F12K y 10% suero (condiciones fisiológicas). A diferencia de los resultados obtenidos en células WIF-B9 cultivadas en condiciones similares (DMEM, 10% suero), donde ATP7B se distribuía entre el aparato de Golgi y el ARE (Guo, Nyasae et al. 2005), en las células Can10 la mayor parte de ATP7B aparecía retenido en el aparato de Golgi y una pequeña parte en vesículas citoplasmáticas (Figura 10).



**Figura 10 | ATP7B se localiza principalmente en el aparato de Golgi en células Can10 cultivadas en condiciones fisiológicas.** Las células Can 10 fueron crecidas durante 7 días en medio F12K y teñidas con el anticuerpo policlonal anti-ATP7B, Ab1 (canal FITC) y el monoclonal anti-Rab11 (canal Texas Red), como marcador del ARE (canal Texas Red). Obsérvese en el panel A como ATP7B se localiza principalmente en el Golgi y en pequeñas vesículas distribuidas por el citoplasma y en el ARE. **Barra** 20 $\mu$ M.

### 1.4 ATP7B es retenido en el mismo compartimento de la red trans del Golgi que la t-SNARE syntaxina 6.

Para determinar la naturaleza del compartimento del Golgi donde ATP7B era retenido, estudiamos por microscopía su distribución en células Can10 tratadas con BCS, que tras ser fijadas y permeabilizadas, fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo Ab1 y los anticuerpos contra proteínas residentes en las membranas de los tres principales compartimentos

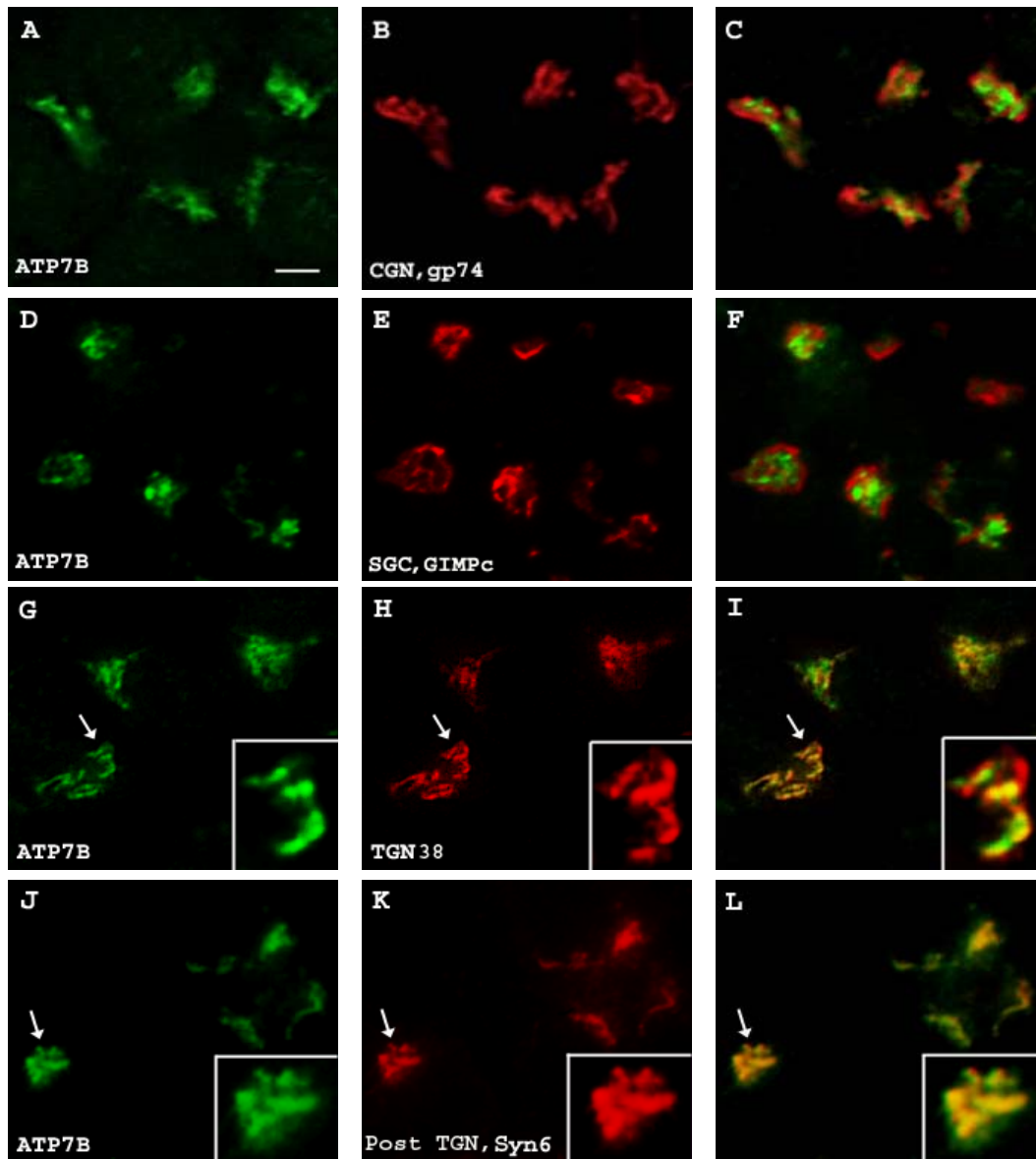
del aparato de Golgi: la gp74, residente en la red *cis* del Golgi (CGN); la GIMPc, retenida en las cisternas medias (SGC); la TGN38 marcador de la red *trans* del Golgi (TGN) y la syntaxina 6, residente en un compartimento del Golgi que forma parte de la TGN pero es posterior al compartimento que retiene a la TGN38 (Alcalde, Egea et al. 1994, Yuan, Barriocanal et al. 1987, Yuan, Barriocanal et al. 1987, (Bock, Klumperman et al. 1997).

Como puede observarse en la figura 11, en las células Can10 tratadas con BCS, el ATP7B no colocalizó en absoluto ni con la gp74 (Figura 11, C), ni con la GIMPc (Figura 11, F), mostró una colocalización extensa pero parcial con la TGN38 (Figura 11, I) y colocalizó totalmente con la syntaxina 6 (Figura 11, L).

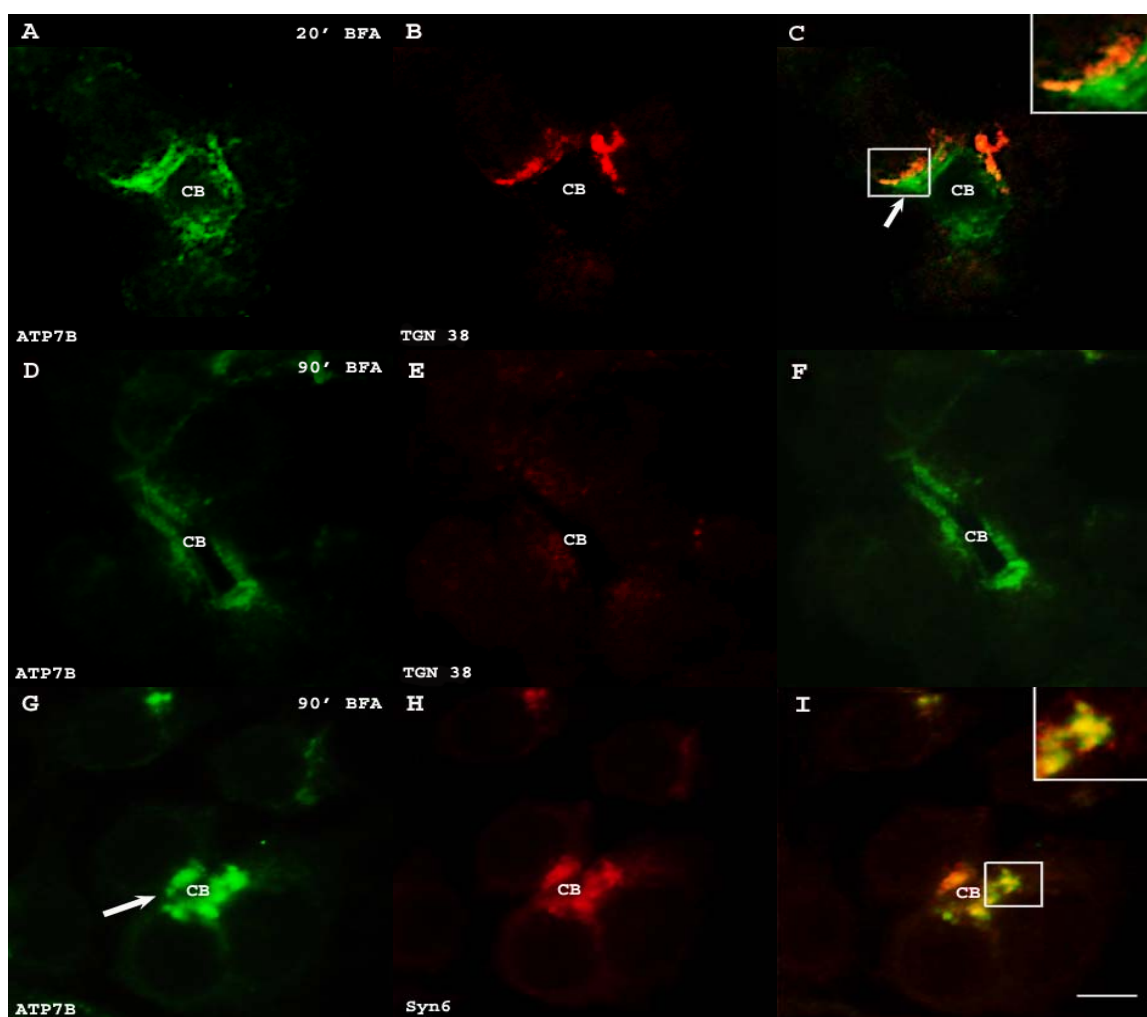
La brefeldina A (BFA) es una droga que provoca fuertes cambios estructurales en el aparato de Golgi, sobre todo facilitando el transporte retrógrado de los componentes de la CGN y las cisternas al retículo endoplasmático, siendo sus efectos sobre la TGN y otros compartimentos *trans* de la vía secretora, más limitados (Lippincott-Schwartz, Yuan et al. 1989; Wood, Park et al. 1991). Además, los componentes de la CGN responden a la BFA más rápidamente que los de las cisternas (Alcalde, Bonay et al. 1992). Por todo ello, la BFA es una excelente herramienta que permite distinguir por microscopía óptica los diferentes compartimentos del aparato de Golgi, y determinar, por tanto, en que compartimento residen las proteínas, sujeto de estudio.

Así pues, para confirmar la localización de ATP7B en la TGN, comparamos su respuesta y la respuesta de los marcadores de los diferentes compartimentos del Golgi a la BFA. Para ello, tratamos las células Can10 con la droga a una concentración de 10µg/µl durante 5, 20, 60 y 90 minutos, y estudiamos por microscopía de inmunofluorescencia las correspondientes respuestas. A los 5 minutos, pudimos observar como la gp75 retenida en la CGN sufría una relocalización consistente en su desaparición de ésta y su aparición en pequeñas vesículas, sin que fuese detectado ningún cambio en los compartimentos que contenían a la TGN38, al ATP7B y a la syntaxina 6 (dato no mostrado). Por el contrario, 20 minutos después de la adición de la droga, como ya había sido descrito anteriormente por Vonk en células HepG2 (Roelofsen, Wolters et al. 2000), ATP7B fue encontrado en el ARE, compartimento situado en cultivos de células Can10 en la proximidad del canalículo biliar, rico en Rab11 y que opera, como he descrito en la Introducción, en la distribución y reciclamiento de proteínas apicales de membrana plasmática (Figura 10, B). Es más, tras 90 minutos de tratamiento con BFA, el compartimento que contenía a la TGN38 había sido desensamblado completamente y la translocación de ATP7B al ARE era completa (Figura 12, D-F). A este respecto, y consistente con la retención de ATP7B en el compartimento *trans* donde es retenida la syntaxina 6, también

observamos que la respuesta a la BFA de la syntaxina 6 era idéntica a la de ATP7B (Figura 12, I).



**Figura 11 | Retención de ATP7B en el compartimento de la red *trans* del Golgi rico en syntaxina 6 en células Can10 con bajos niveles de cobre.** Las células Can 10 fueron tratadas con 200 $\mu$ M BCS durante 4h para quelar el metal y disminuir los niveles celulares de  $\text{Cu}^{2+}$ , y tras ser fijadas y permeabilizadas fueron teñidas con el anticuerpo Ab1 (canal FITC) y separadamente, los anticuerpos monoclonales (canal Texas Red), contra el marcador de la red cis del Golgi gp74 (CGN, panel B), el marcador de las cisternas medias  $\text{GMP}_{c-1}$  (SGN, panel E), el marcador de la red trans del Golgi TGN38 (TGN, panel H), y el marcador post-TGN, syntaxina 6 (Syn6, panel K). Obsérvese en los paneles C, F, I, L (canales superpuestos) como ATP7B no es un componente de la CGN y el SGN, mientras que es detectado en la TGN38 y más abundantemente en el compartimento post-TGN. **Barra** 20 $\mu$ M.



**Figura 12 | La BFA, provoca la translocación de ATP7B desde la TGN al compartimento subapical o ARE en las células Can10.** Las células Can10 fueron tratadas con 10 $\mu$ g/ml de BFA durante 5, 20, 60 y 90 min y teñidas con los anticuerpos específicos contra ATP7B, TGN38 y sintaxina 6, como se indica en los paneles. Obsérvese como a los 20 minutos de tratamiento (paneles A-C) parte de ATP7B (canal FITC) ha sido translocado junto con la sintaxina 6 al ARE, manteniéndose una colocalización parcial con el marcador de la red *trans* del Golgi, TGN38 (canal rojo, Texas Red). Finalmente, tras 90 minutos de tratamiento con BFA (paneles D-F) todo el ATP7B antes retenido en el compartimento post-TGN, ha sido translocado casi en su totalidad al ARE donde colocaliza con la sintaxina 6 (paneles G-I). La flecha marca el ARE situado en la proximidad del canalículo biliar (CB). Barra 20 $\mu$ M.

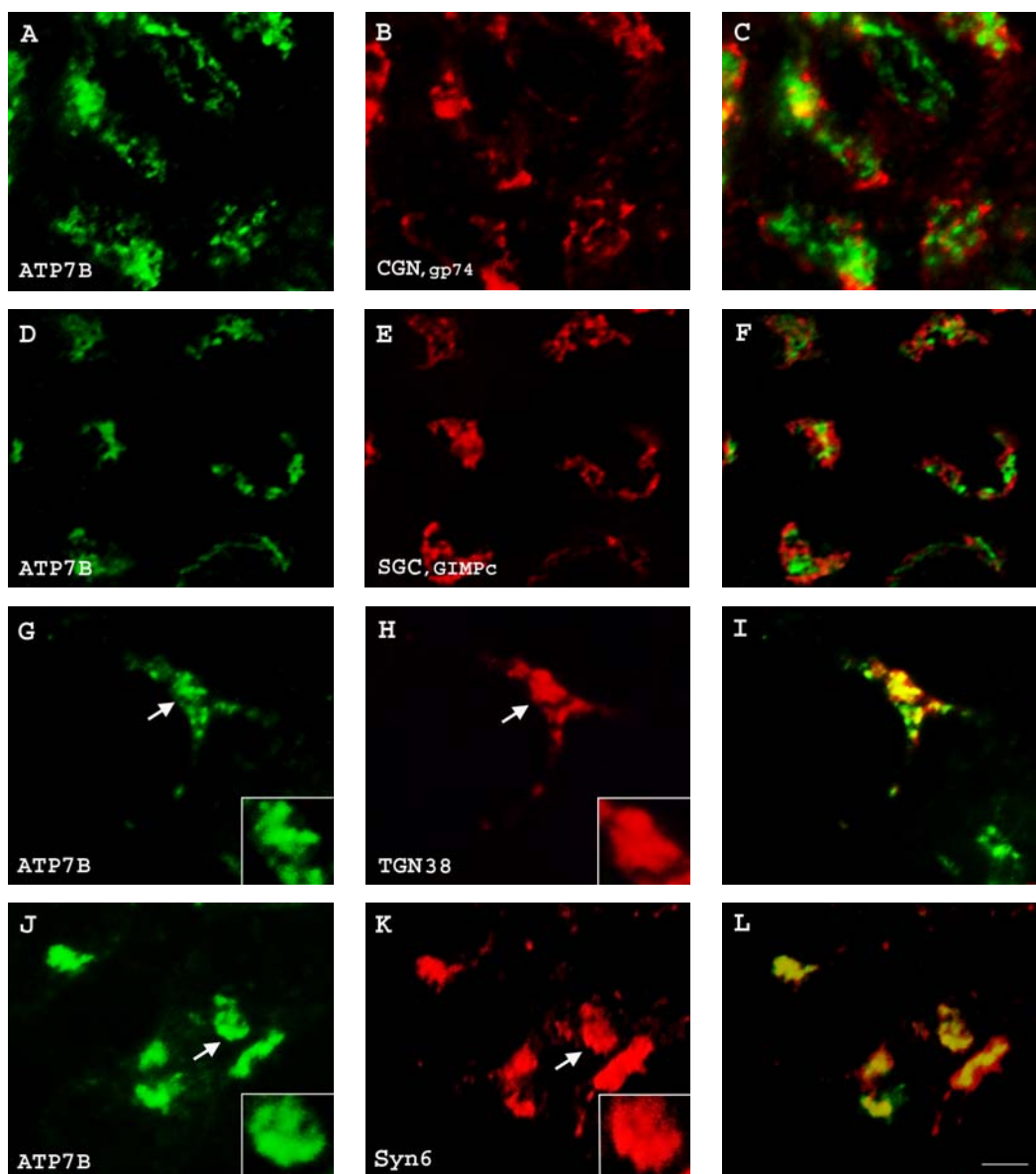
La translocación de ATP7B desde la TGN al compartimento subapical provocado por la BFA, nos hizo preguntarnos si dicha translocación dependía del cobre. Para responder a esta cuestión, antes de añadir BFA, tratamos las células durante 4h con 200 $\mu$ M BCS. Los resultados mostraron que cuando se mantenía la BCS en el medio de cultivo, la respuesta de ATP7B tras 20, 60 y 90 minutos de incubación con BFA, no era afectada por la disminución de los niveles

de cobre en la célula, lo que indicaba que en determinadas condiciones, ATP7B podía salir del compartimento de retención sin que la concentración de cobre celular fuera condicionante (datos no mostrados).

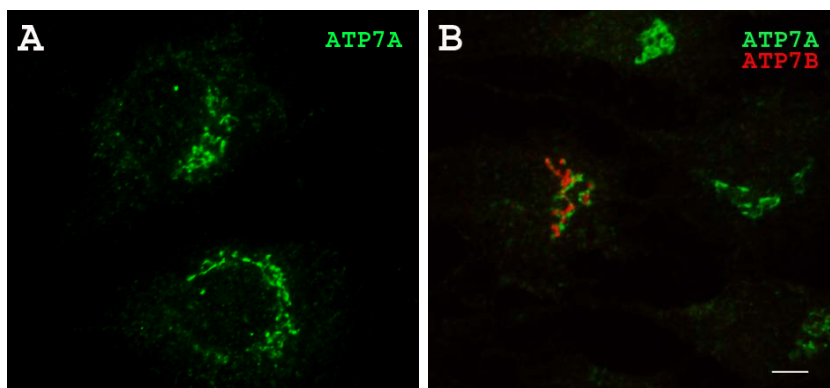
En otro abordaje independiente, pero con el mismo objetivo de caracterizar el compartimento de retención de ATP7B, estudiamos la respuesta del transportador en células Can10 tratadas con el macrólido Ro-0900179 (Ro). El macrólido Ro apenas afecta la integridad de la red *cis* del Golgi (CGN), mientras que provoca una extensa fragmentación de las cisternas (SGC) y de la red *trans* del Golgi (TGN). Además, en las células tratadas con Ro, los elementos intactos de la CGN envuelven a los fragmentos más extensos de las cisternas, y éstos a los fragmentos más pequeños de la TGN (Sandoval and Carrasco 1997). Por ello, las células Can10 fueron incubadas con 10µg/ml de Ro-0900179 durante 90 minutos y estudiamos por microscopía de inmunofluorescencia la distribución del ATP7B retenido en el Golgi, utilizando el anticuerpo Ab1 y los monoclonales anti-gp74, GIMPC, TGN38 y syntaxina 6. Como puede observarse, las respuestas de la CGN y del SGC a Ro, fueron diferentes a la del compartimento que retenía a ATP7B, observándose además como los elementos de ambos, envolvían a los teñidos con el anticuerpo Ab1 (Figura 13, C y F). Es más, el estudio detallado de los compartimentos que retienen a ATP7B, TGN38 y syntaxina 6, reveló diferencias sutiles pero significativas en las células tratadas con Ro. Si se comparan las imágenes ampliadas de ATP7B y TGN38 (Figura 13, G y H) puede observarse como tras el tratamiento con Ro la morfología del compartimento que retenía a ATP7B era distinta a la que retenía a la TGN38, apareciendo el compartimento en el que ATP7B era retenido, más fragmentado. Sin embargo, la comparación de las imágenes de ATP7B y syntaxina 6 (Figura 13, J y K) no revelaron diferencias substanciales entre las dos proteínas. Estas observaciones y los resultados descritos en los experimentos realizados con BFA, indicaban pues, que ATP7B era retenido en el mismo compartimento *trans* que la syntaxina 6.

### **1.5 ATP7B y ATP7A son retenidos en compartimentos diferentes dentro del aparato de Golgi.**

En el transcurso de los estudios sobre ATP7B en células NRK y COS-7 transfectadas con el transportador hepático, y tras saber que ATP7B era retenido en la TGN (Figuras 11 y 13), observamos en células NRK transfectadas con el cDNA de ATP7B al que habíamos insertado el epítipo HA en el tercer bucle exofacial, y teñidas con anticuerpos para ambos transportadores, que aunque los dos eran retenidos en el Golgi, los compartimentos en los que la retención tenía lugar, aunque estrechamente yuxtapuestos, parecían ser diferentes (Figura 14). Esta observación nos llevó a profundizar en la caracterización del compartimento donde ATP7A era retenido.



**Figura 13 | Efecto de Ro-0900179 sobre el compartimento que retiene a ATP7B dentro del aparato de Golgi en células Can10.** Las células Can10, fueron tratadas con 10 $\mu$ g/ml de Ro durante 90 min, y posteriormente doblemente teñidas con los anticuerpos Ab1 y los monoclonales específicos de los distintos compartimentos indicados en los paneles, que constituyen el aparato de Golgi. Obsérvese como tras el tratamiento con Ro, la CGN y el SGN envuelven al compartimento que contiene a ATP7B, y existen ligeras diferencias al comparar el compartimento que alberga a la TGN38 con el de ATP7B, diferencias que no se aprecian con el compartimento que retiene a sintaxina 6, sugiriendo una vez más que ATP7B y sintaxina 6, pudieran alojarse en el mismo compartimento. Barra 20 $\mu$ M.



**Figura 14 | Los transportadores de cobre, ATP7A y ATP7B se encuentran retenidos en distintos compartimentos.** Las células NRK se transfectaron con el cDNA de ATP7B al que se le había insertado el epítipo HA, durante 15 horas seguido de 3 horas de incubación con 10 $\mu$ M cicloheximida. Una vez fijadas y permeabilizadas se tiñeron con el anticuerpo policlonal anti-ATP7A (canal FITC) y el monoclonal 16B12 contra el epítipo HA (canal Texas Red) para detectar al ATP7B. En el panel A mostramos dos células NRK sin transfectar, donde puede apreciarse la expresión del ATP7A endógeno y en el panel B observamos una célula transfectada con el ATP7B en rojo, donde claramente puede apreciarse como ambos transportadores se encuentran localizados en compartimentos distintos.

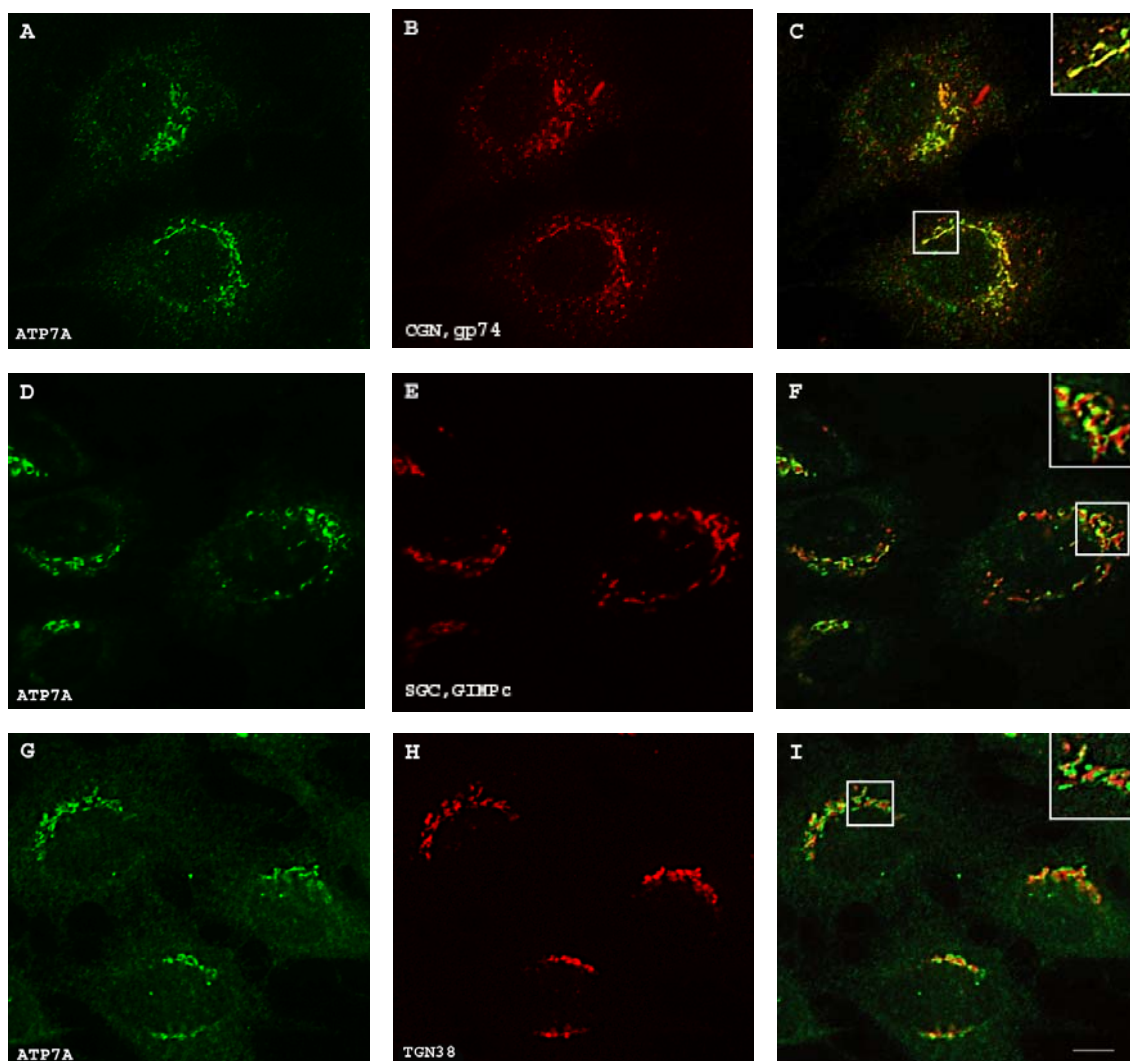
## 1.6 ATP7A es retenido en la red cis del Golgi (CGN).

Para estudiar la retención de ATP7A en el Golgi, procedimos a comparar en células NRK teñidas con anticuerpos específicos y estudiadas por microscopía de fluorescencia, la localización de ATP7A en el Golgi comparándola con la de los marcadores de los tres compartimentos principales, CGN, SGC y TGN. En estos estudios pudimos observar como el transportador de cobre ATP7A (Figura 15, A, D y G), colocalizaba perfectamente con la proteína gp-74 marcador de red *cis* del Golgi (Figura 15, B y C) y por el contrario no lo hacía ni con el marcador GIMPc de las cisternas (Figura 15, E y F), ni con el de la red *trans* del Golgi (Figura 15, H e I). A este respecto cabe señalar que cuando repetimos el experimento en células COS-7, el resultado fue el mismo (no mostrado).

Con el fin de confirmar las observaciones anteriores estudiamos, al igual que hicimos en los estudios de retención de ATP7B en la TGN, la respuesta del compartimento que retenía a ATP7A a las drogas BFA y Ro. Para ello, tratamos las células NRK durante 5, 10, 20 y 90



minutos con 10 $\mu$ g/ml de BFA y posteriormente, las teñimos doblemente para visualizar ATP7A y los tres compartimentos de Golgi (Figura 16).



**Figura 15 | Estudio de la localización del transportador de cobre ATP7A en el aparato de Golgi en células NRK que lo expresan de forma endógena.** Las células NRK se crecieron sobre cubres durante 48 horas, se fijaron con metanol frío (-20° C) durante 3 minutos y se tiñeron doblemente con el anticuerpo policlonal contra ATP7A (paneles A, D y G; canal FITC) y los monoclonales contra los marcadores de las distintas regiones del Golgi (paneles B, E y H canal del *Texas Red*). En la superposición de los canales, puede observarse como ATP7A codistribuye con la CGN y no lo hace ni con las cisternas (SGC) ni con la TGN38.



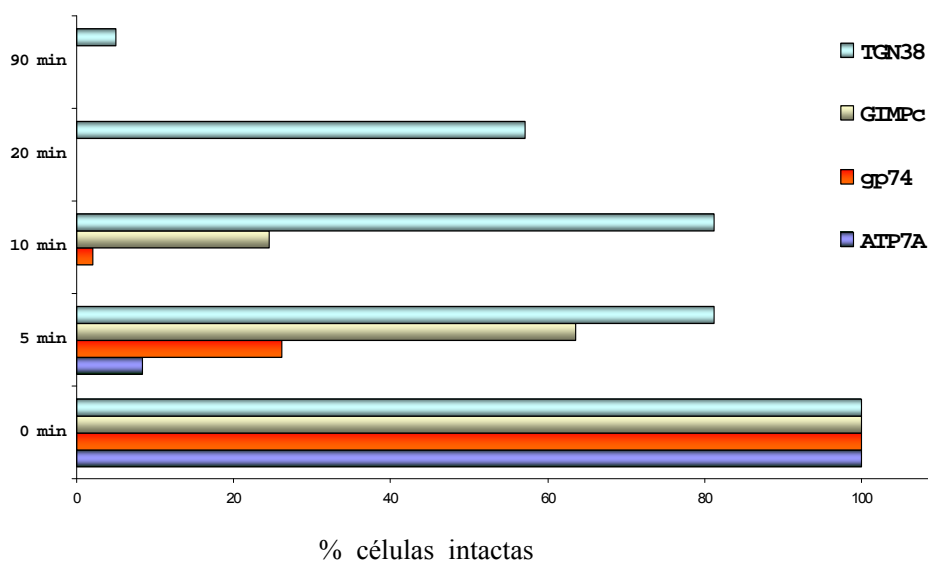
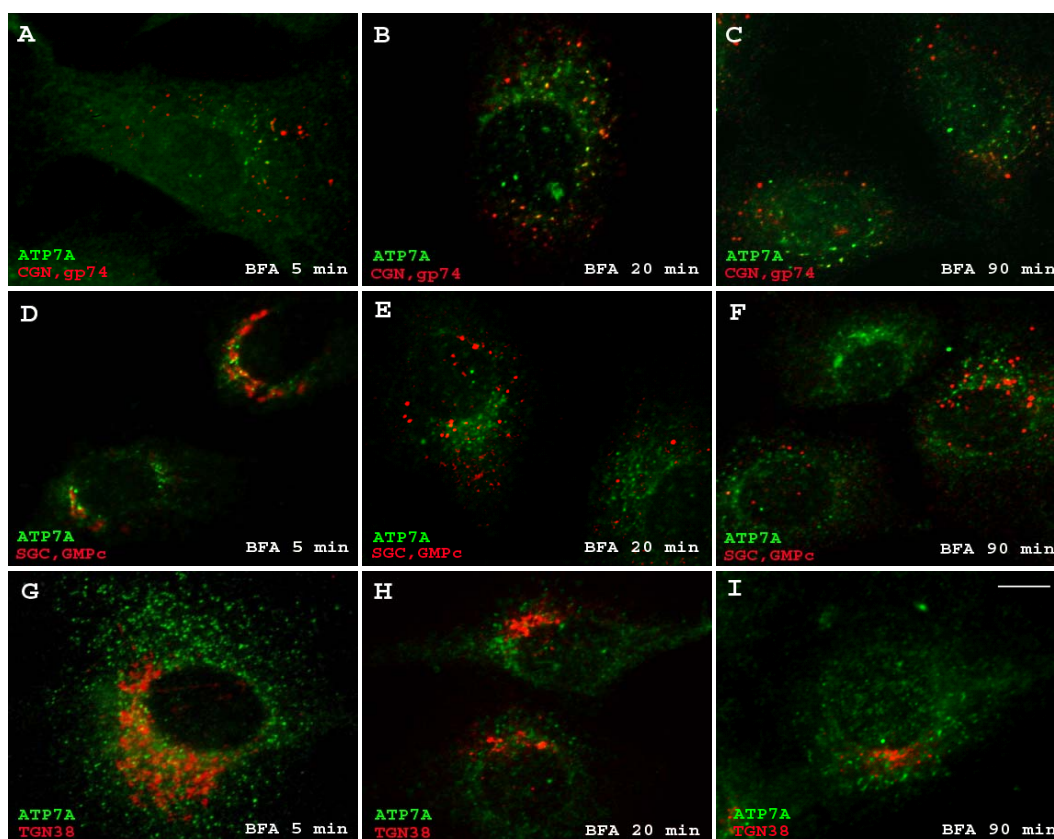
Así, pudimos observar que tras 5 minutos de tratamiento con BFA, el compartimento más afectado era el correspondiente al ATP7A, que a juzgar por la tinción de éste, sólo permanecía intacto en un 8% de las células, mientras que las células que presentaban la CGN, SGN y TGN intactas fueron un 26%, 64% y 98%, respectivamente. Transcurridos 10 minutos los porcentajes de las células con el compartimento intacto fueron 0,1%, 2%, 24% y 81% para ATP7A, CGN, SGN y TGN, respectivamente. A los 20 minutos, pudo observarse que los compartimentos del Golgi que contenían a ATP7A, y los marcadores de la CGN y el SGC habían desaparecido completamente, y sólo un 57% de las células teñidas mostraban la TGN intacta. Estos resultados indicaban pues, que el compartimento que retenía a ATP7A era desensamblado con gran rapidez ( $t_{1/2}$  = 5 min) característica ésta de los compartimentos más cis del Golgi, y por tanto, no era retenido en la TGN como se ha creído hasta el momento (Yamaguchi, Heiny et al. 1996).

A continuación, tratamos las células NRK con 10µg/ml de Ro durante 90 minutos, y de nuevo estudiamos por microscopía de inmuofluorescencia la respuesta de ATP7A y de los tres compartimentos principales del Golgi. El tratamiento con Ro, provocó cambios morfológicos en el compartimento que retenía al ATP7A, característicos de la CGN (Figura 17, A-C).

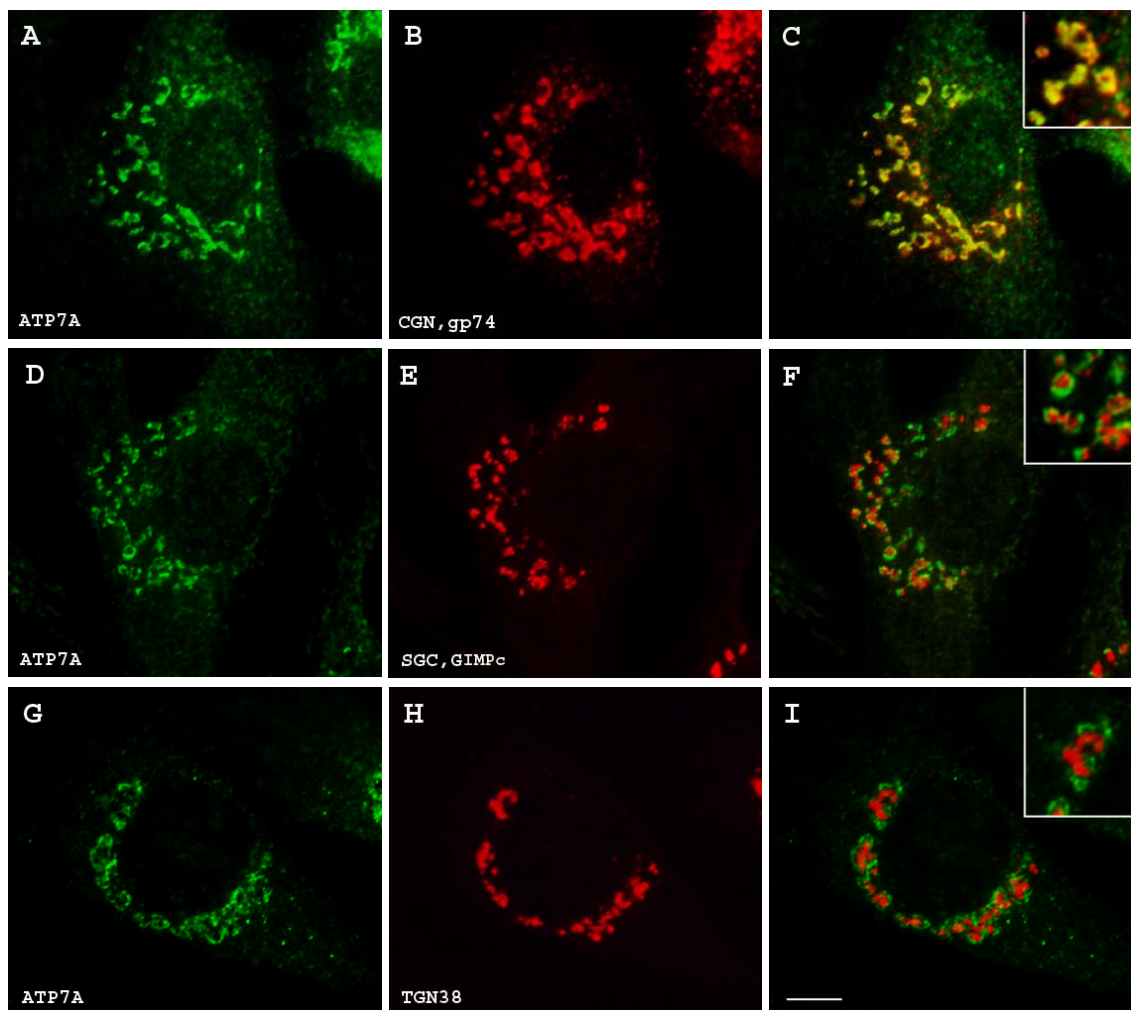
Por tanto, los resultados de los estudios de distribución de ATP7B y ATP7A dentro del Golgi y su respuesta a los tratamientos con BFA y Ro, indicaron claramente que ambos transportadores eran retenidos en compartimentos diferentes. Así, mientras ATP7B colocalizaba con syntaxina 6, ATP7A lo hacía con el marcador de la CGN gp74. Igualmente, el tratamiento con BFA provocó la translocación de ATP7B al compartimento subapical, mientras que produjo el rápido desensamblaje del compartimento donde se alojaba ATP7A. Por el contrario, el tratamiento de las células con Ro afectó más al compartimento donde se alojaba ATP7B pero no al de ATP7A. En conjunto estos resultados indicaban, que ATP7A era retenido en la CGN y ATP7B lo era en la TGN.

### **1.7 ATP7B es retenido en el mismo compartimento de la TGN que el transportador de Glucosa sensible a insulina GLUT4.**

Estudios realizados anteriormente en el laboratorio, habían demostrado que en adipocitos 3T3-L1 mantenidos en condiciones basales (4h, DMEM sin suero), el transportador de glucosa sensible a la hormona, GLUT4, era retenido en la red *trans* del Golgi resistente a



**Figura 16 | Efecto de la BFA sobre el aparato de Golgi en células NRK.** Las células NRK se crecieron sobre cubres durante 48 horas y posteriormente se trataron con BFA 10 $\mu$ g/ml a distintos tiempos (5, 10 20 y 90 min). A continuación, se tiñeron doblemente con el anticuerpo policlonal anti-ATP7A (canal FITC) y los monoclonales marcadores de la CGN (paneles A-C), SGC (paneles D-F) y la TGN (paneles G-I). Obsérvese en los distintos paneles de la figura como en el gráfico de barras, como tanto el compartimento que contiene a ATP7A y a gp74, desaparece 10 minutos después de la adición de la BFA, mientras que el compartimento que contiene a la GIMPc lo hace a los 20 minutos y la TGN, 60 - 90 minutos después de la adición de la BFA.

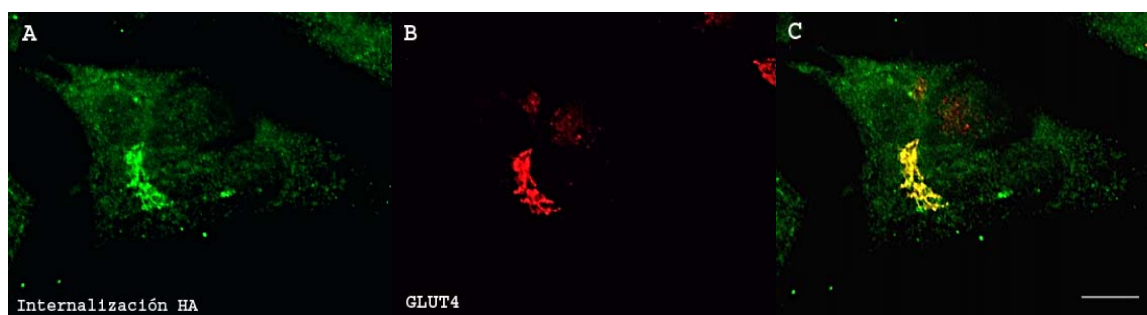


**Figura 17 | Efecto de la droga Ro-0900179 sobre los distintos compartimentos del aparato de Golgi en las células NRK.** Las células NRK se crecieron sobre cubres durante 48 horas, posteriormente se trataron con la droga Ro 10 $\mu$ g/ml. A continuación, se tiñeron doblemente con el anticuerpo policlonal anti-ATP7A (canal FITC) y con los monoclonales marcadores de la CGN (panel B), SGC (panel E) y de la TGN (panel H). Obsérvese en la superposición de los canales, como los elementos formados tras el tratamiento con la droga Ro y que contienen al ATP7A y al marcador de CGN, codistribuyen totalmente (panel C). No sucede lo mismo cuando se compara el ATP7A con las cisternas (SGC) (paneles D-F) y con la TGN, donde se observa claramente como las estructuras que contienen al ATP7A, envuelven a los demás elementos.

BFA (Martinez-Arca, Lalioti et al. 2000; Palacios, Lalioti et al. 2001). Por otra parte, la descripción que en condiciones fisiológicas (bajos niveles de cobre celular), ATP7B es retenido en la red *trans* del Golgi (Hung, Suzuki et al. 1997; Nagano, Nakamura et al. 1998; Suzuki and

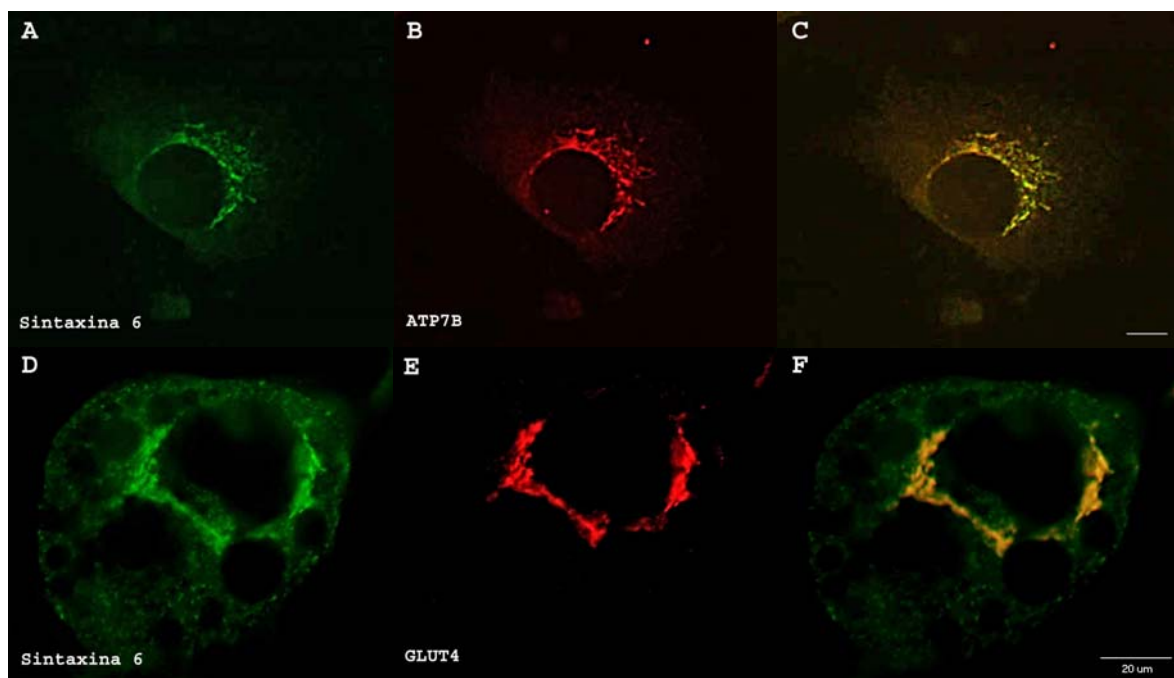
Gitlin 1999), nos condujo a estudiar si las células poseían un compartimento dentro de la TGN, donde fueran retenidas las proteínas de membrana plasmática que sólo aparecen en ésta para corregir las desviaciones de las constantes fisiológicas en cuya regulación están implicadas.

Para comprobar si el compartimento donde era retenido ATP7B coincidía con el de GLUT4, transfectamos el cDNA de ATP7B(HA) en un clon de fibroblastos 3T3-L1 que expresaba de forma estable GLUT4. La inserción del epítipo HA en el tercer bucle exofacial de ATP7B (véase materiales y métodos) tenía como objeto, evitar posibles interferencias de sobreexpresión de ATP7B. Así, en lugar de teñir las células transfectadas con el anticuerpo Ab1, marcamos el compartimento de ATP7B con el anticuerpo anti-HA internalizado por endocitosis. El diseño experimental, se basó en estudios previos de GLUT4 en el mismo clon de fibroblastos 3T3L1, y en la observación de que un anticuerpo desarrollado contra el primer bucle exofacial de GLUT4, era internalizado y retenido en su totalidad dentro de la TGN (Palacios, Lalioti et al. 2001). En este caso, los fibroblastos 3T3-L1 (GLUT4) fueron transfectados con ATP7B (HA) e incubados 1 hora con el anticuerpo anti-HA (16B12). Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas 1 hora más en medio de cultivo sin anticuerpo. Como puede observarse en la figura 18, el ATP7B endocitado fue retenido en el mismo compartimento reticular y yuxtannuclear de la TGN que retenía GLUT4.



**Figura 18 | El ATP7B endocitado es reciclado a la TGN, siendo retenido en el mismo compartimento que el GLUT4 endógeno en fibroblastos 3T3L1 que lo expresan de forma estable.** Los fibroblastos fueron transfectados con el cDNA de ATP7B (HA), y se estudió la distribución de anticuerpo HA internalizado con el ATP7B (HA) endocitado durante 1h seguido de 1h de caza. Las células fijadas con 3% PFA y permeabilizadas con 0.2% Tritón X-100 fueron teñidas con el anticuerpo 828 policlonal contra Glut4 y a continuación con el secundario contra el anticuerpo HA de ratón (panel A, canal verde) y el GLUT4 de conejo (panel B, canal rojo). Obsérvese en el panel C, canales superpuestos, la retención de ATP7B en el mismo compartimento que retiene a GLUT4.

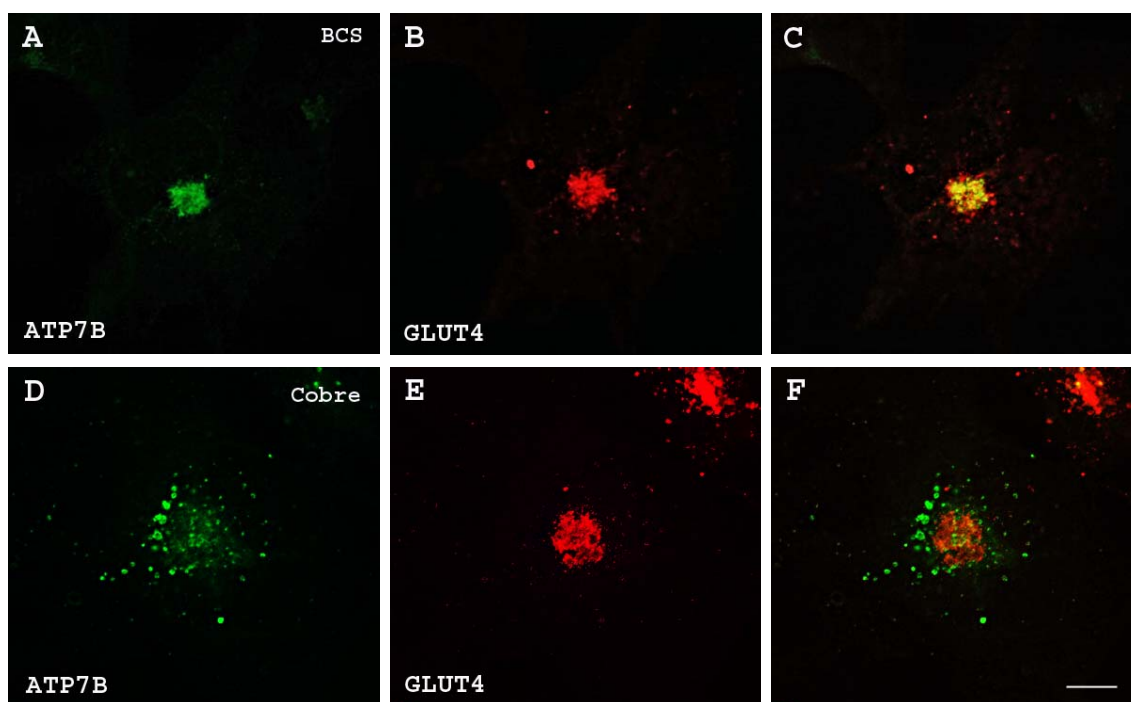
Este resultado fue confirmado de forma independiente en un segundo experimento, en el que examinamos la codistribución de GLUT4 con la t-SNARE sintaxina 6, proteína que habíamos comprobado que residía en el compartimento que retiene a ATP7B en las células Can10, en adipocitos 3T3-L1 diferenciados. Los resultados del experimento mostraron que al igual que ATP7B, GLUT4 codistribuía con sintaxina 6 en adipocitos 3T3-L1 (Figura 19, D-F).



**Figura 19 | En ausencia de cobre, ATP7B es retenido al igual que GLUT4 en el compartimento de la TGN donde se localiza la sintaxina 6.** Las células WIF-B9 cultivadas 14 días en medio F12K para fomentan la formación de canaliculos biliares, fueron tratadas con 200μM BCS durante 4 horas fueron fijadas, permeabilizadas y posteriormente teñidas con los anticuerpos contra sintaxina 6 (panel A, canal FITC) y Ab1 contra ATP7B (panel B, canal Texas Red). Obsérvese en la superposición de ambos canales (panel C), la localización de ambas proteínas en el mismo compartimento. En el panel F, puede observarse como sucede lo mismo con GLUT4 (panel E, canal Texas Red) y sintaxina 6 (panel D, canal FITC) en adipocitos diferenciados.

A continuación, consideramos interesante estudiar si la salida de ATP7B afectaba o no a la retención de GLUT4 en el mismo compartimento de la TGN. Para ello, cotransfectamos células COS-7 con los cDNAs de GLUT4 y ATP7B y tras 15 horas de transfección, incubamos las células con 200μM bazocupreína (BCS) para disminuir el cobre de la células por debajo de los niveles fisiológicos o con 200μM CuCl<sub>2</sub> para elevarlos. El estudio por microscopía óptica de

las distribuciones celulares de ATP7B y GLUT4 mostró que mientras que en las células tratadas con BCS ATP7B y GLUT4 eran retenidos en el mismo compartimento de la TGN (Figura 20, A-C), después de ser tratadas con  $\text{CuCl}_2$  sólo ATP7B dejaba la TGN y aparecía en vesículas distribuidas por el citoplasma (Figura 20, D-F).

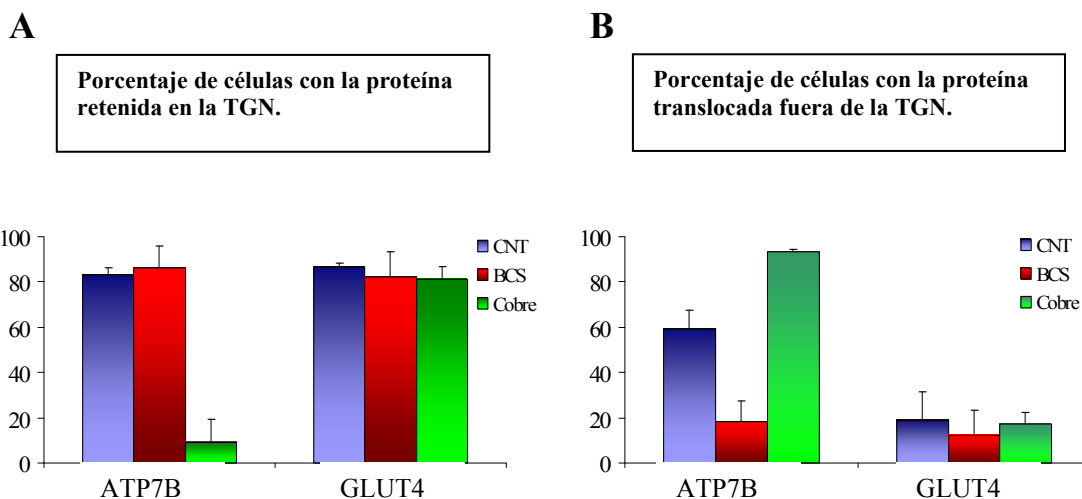


**Figura 20 | ATP7B y GLUT4 son retenidos en el mismo compartimento en condiciones de bajo cobre intracelular y sólo ATP7B es liberado y translocado a vesículas al aumentar la concentración de cobre en el medio de cultivo.** Se cotransfectaron células COS-7 con los cDNAs de los dos transportadores y se incubaron con 200  $\mu\text{M}$  BCS o con 200  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  durante 4 horas. Las células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas con los anticuerpos contra ATP7B (canal verde) y 1F8 contra GLUT4 (canal rojo). En el panel C, puede observarse como ATP7B y GLUT4 se encuentran retenidos en el mismo compartimento en ausencia de cobre, y en el panel F mostramos como ATP7B es translocado a vesículas y a la membrana plasmática, en respuesta al aumento de cobre intracelular.

La cuantificación del porcentaje de células transfectadas que presentaban ATP7B retenido en la TGN en las distintas condiciones del experimento (Figura 21) fue de un 59% en las células cultivadas en medio sin adiciones, de un 18% en las células tratadas con BCS y de 93% en las células tratadas con  $\text{CuCl}_2$ . Por otra parte, el porcentaje de células con ATP7B translocado fuera de la TGN fue de un 83% en las células cultivadas en medio sin adiciones y de un 86% y un 9% en las células tratadas con BCS y con cobre, respectivamente. Estos datos mostraban la translocación masiva de ATP7B fuera de la TGN bajo condiciones de alto cobre



celular. Sin embargo, cuando estudiamos el comportamiento de GLUT4, pudimos observar como los niveles de cobre celular no afectaban ni a su retención en la TGN, ni a su translocación fuera de ella, siendo los porcentajes de las células tratadas en las tres condiciones más o menos iguales. Estos resultados indicaban pues, que a pesar de que ambos transportadores eran retenidos en el mismo compartimento, su distribución celular respondía a estímulos propios.



**Figura 21 |** Porcentaje de células COS-7 transfectadas con los cDNAs de ATP7B y GLUT4 y cultivadas por 4h en medio DMEM completo sin aditivos (control), suplementado con 200 $\mu$ M BCS o con 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, que muestran las proteínas retenidas en la TGN (panel A) o translocadas fuera de ella (panel B).

## 2. ATP7B es translocado desde la TGN al canalículo biliar, en respuesta al aumento del cobre intracelular.

### 2.1. Antecedentes experimentales.

En lo que se refiere a la respuesta de ATP7B a altas concentraciones de cobre, los resultados descritos hasta el momento, han sido encuadrados en dos modelos radicalmente diferentes: El primero, prevalente, y basado en los estudios de Gitlin, Mercer y Harada (Schaefer, Hopkins et al. 1999; Harada, Sakisaka et al. 2000; Cater, La Fontaine et al. 2006) propone que a concentraciones altas del metal, ATP7B no es transportado al canalículo biliar, sino a endosomas a los que carga de cobre y que, posteriormente, tras fusionarse éstos entre sí o con los lisosomas, se fusionan con la membrana canalicular para descargar el metal en los

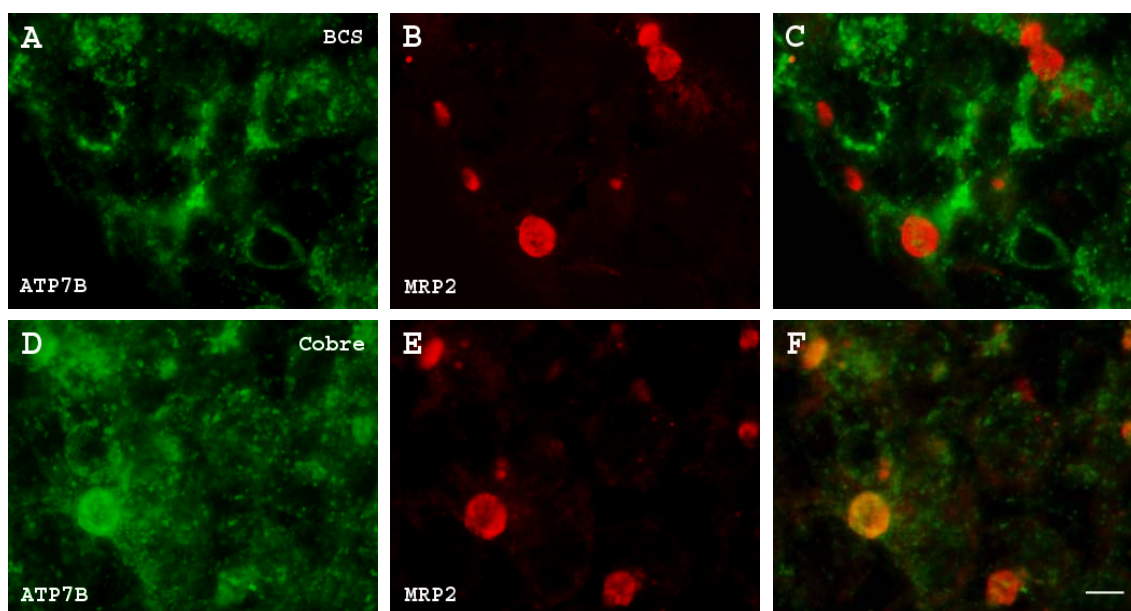
canalículos, proceso que ha sido llamado excreción biliar lisosomal (Harada, Sakisaka et al. 2000). El segundo modelo basado en el estudio de Vonk realizado en células HepG2 (Roelofsen, Wolters et al. 2000) y más indirectamente en el de Hubbard realizado en células WIF-B9 (Guo, Nyasae et al. 2005), propone que el cobre promueve la translocación de ATP7B al compartimento subapical (ARE), próximo al canalículo biliar, y posteriormente a la membrana canalicular, funcionando en ésta directamente en el bombeo del cobre fuera de la célula.

## **2.2. Estudio de la respuesta de ATP7B al aumento en los niveles de cobre celular.**

Uno de los objetivos principales de esta tesis, ha sido estudiar si ATP7B es o no translocado o no a la membrana del canalículo biliar en respuesta al aumento de los niveles de cobre en la célula. En un primer estudio empleamos células HepG2 de hepatoma humano, células que habían sido frecuentemente utilizadas en este tipo de estudios (Roelofsen, Wolters et al. 2000; Cater, La Fontaine et al. 2006; Bartee and Lutsenko 2007). Para ello, las HepG2 fueron crecidas 4 días en medio completo (DMEM, 10% suero fetal) para fomentar la formación de los canalículos biliares, mucho más cortos y rudimentarios que los que organizan las células Can10 y usualmente formados por 2, 3 o 4 células, y las incubamos 4 horas con 200 $\mu$ M BCS o 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>.

El estudio por microscopía de las células teñidas con los anticuerpos Ab1 y anti-MRP2 (Figura 22, paneles A-F) y, en concreto, el examen de la translocación de ATP7B a la membrana canalicular, computando los canalículos que contenían o no la proteína, produjo los siguientes resultados: En las células mantenidas en condiciones fisiológicas (medio sin adiciones), el 32% de los canalículos teñidos con el anticuerpo anti-MRP2 contenían cantidades significativas de ATP7B, mientras que en las células tratadas con BCS sólo el 5% de los canalículos mostraban ATP7B y en las células incubadas con CuCl<sub>2</sub>, ATP7B era detectado en el 86% de los canalículos (Figura 22, D).



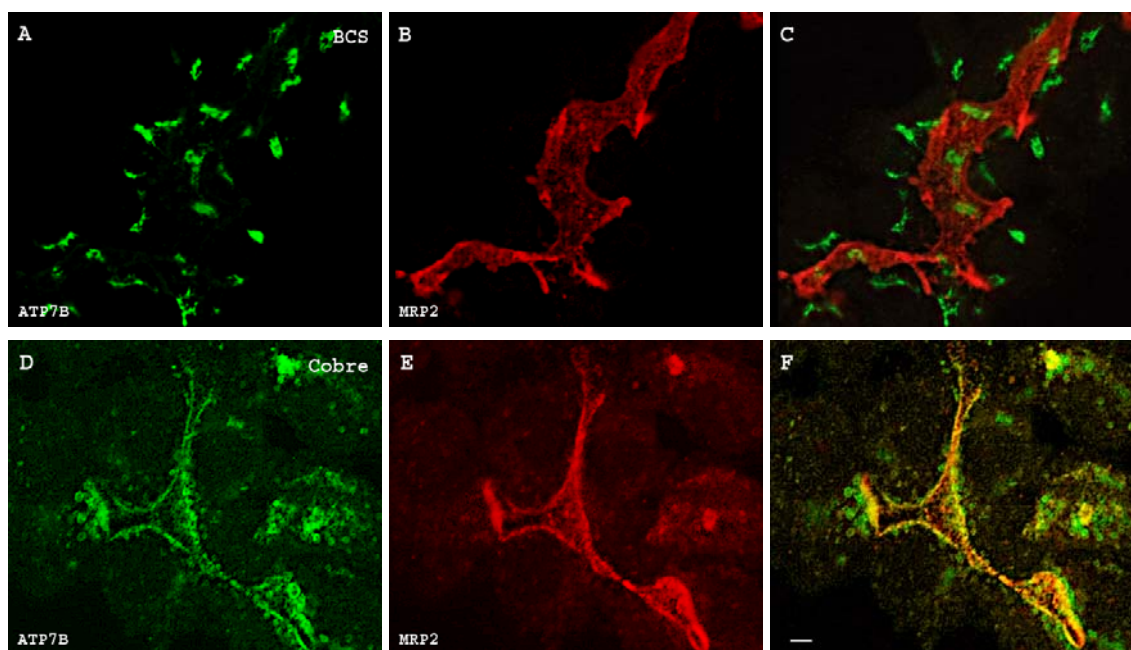


**Figura 22 | ATP7B es translocado a la membrana del canalículo biliar y colocaliza con la proteína marcadora de ésta, MRP2, en células HepG2 tratadas con cobre.** Las células HepG2 fueron cultivadas 4 días en medio DMEM completo, se incubaron por 4h en medio sin adiciones (no mostrado), con 200 $\mu$ M BCS ( paneles A-C), 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> (paneles D-F) y teñidas con los anticuerpos anti-ATP7B (canal verde, fluoresceína) y anti-MRP2 (canal rojo, Texas Red). En el panel G se recogen los porcentajes de canalículos biliares con ATP7B, en cada uno de los tres grupos.

En un segundo paso, repetimos el experimento en las células Can10. Este estudio era la primera vez que se realizaba en estas células de hepatoma que forman canalículos biliares largos y ramificados. Para ello, cultivamos las células Can10 con 200 $\mu$ M BCS o con 200  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>. Las incubaciones fueron realizadas durante 4 horas a 37° C, y las células fijadas fueron teñidas simultáneamente con el anticuerpo Ab1 y el marcador del canalículo biliar, MRP2. El tratamiento de las células con la BCS produjo un cambio dramático en la distribución de ATP7B, ya que prácticamente la totalidad del transportador era retenido en la TGN (Figura 23, A-C). Por el contrario, tras la incubación de las células con CuCl<sub>2</sub>, la TGN perdió su tinción con el anticuerpo anti-ATP7B y éste fue detectado en un gran número de vesículas distribuidas por todo el citoplasma, preferentemente en las proximidades del canalículo biliar, así como en la membrana de los canalículos biliares teñidos con MRP2 (Figura 23, D-F) o con un anticuerpo contra HA-4, también marcador de los canalículos biliares (dato no mostrado).

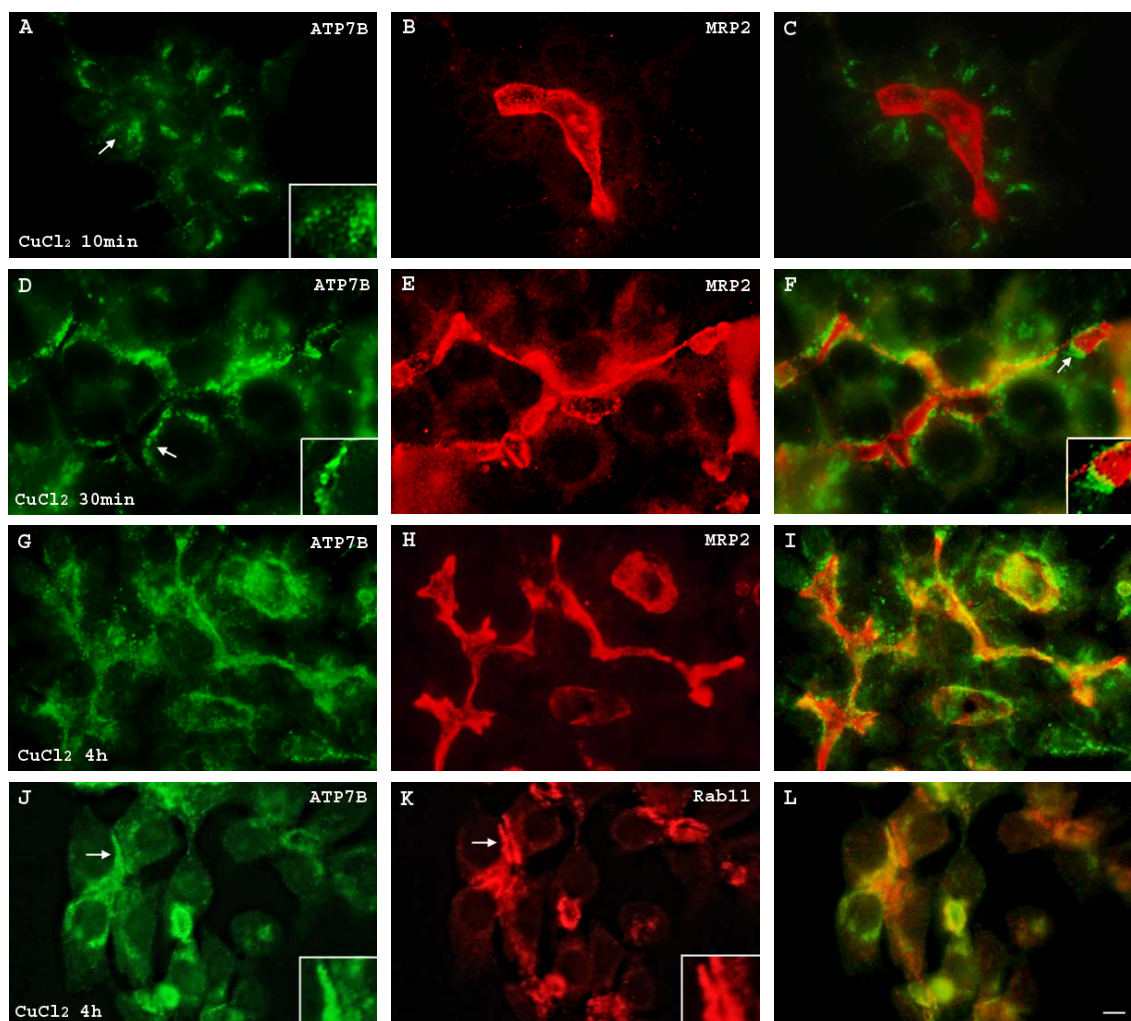
El estudio detallado de la redistribución de ATP7B en células Can10, tras su salida de la TGN a intervalos de tiempo entre 2 min y 4 h, después de la adición de CuCl<sub>2</sub> al medio de cultivo, se ilustra en la figura 24 y los resultados pueden resumirse como sigue: primero, la rápida salida de ATP7B del Golgi ya transcurridos 10 minutos de la adición del cobre al medio

de cultivo, un 30% de las células mostró una clara disminución en la tinción del Golgi con el anticuerpo Ab1, y la tinción de un alto número de vesículas en su proximidad y por todo el citoplasma (Figura 24, A), todo ello sin apreciarse un aumento en la tinción de ATP7B en el canalículo biliar. Transcurridos 30 minutos, las vesículas más pequeñas desaparecieron y un 79% de las células, mostraron numerosos racimos de vesículas grandes cargadas con ATP7B en su la proximidad de los canalículos biliares (Figura 24, D y F). Pasadas 2 horas, las paredes de los canalículos biliares mostraron cantidades significativas de ATP7B, siendo el porcentaje de canalículos que se tiñeron con el anticuerpo Ab1 del 41%. Finalmente, a las 4 horas observamos una reducción substancial en el número de vesículas grandes, probablemente como resultado de su fusión con el canalículo biliar, y un aumento en el número de canalículos que contenían ATP7B, ascendiendo el porcentaje al 80%.



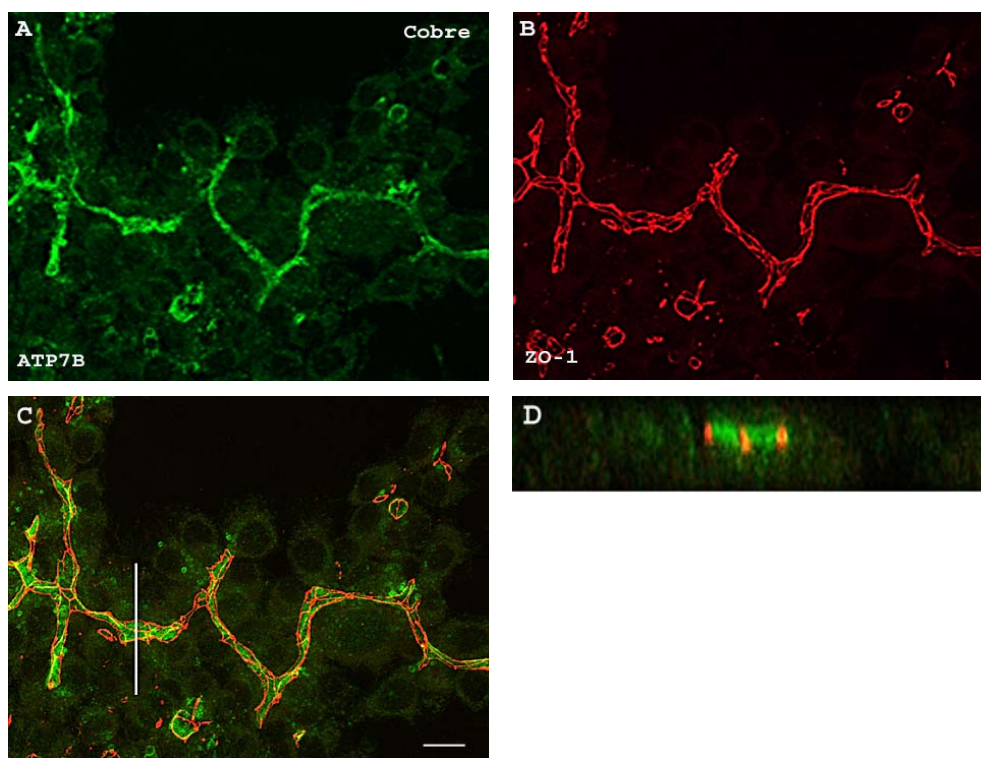
**Figura 23 | ATP7B es retenido en el Golgi de células Can10 con bajos niveles de cobre y sale de él tras aumentar los niveles del metal.** Las células Can10 fueron crecidas durante 7 días para permitir la formación de canalículos biliares. Para estudiar la redistribución de ATP7B en respuesta a cambios en los niveles de cobre, en el 7º día fueron incubadas 4 horas con 200μM BCS (paneles A-C) o con 200μM CuCl<sub>2</sub> (paneles D-F), y tras ser fijadas, se tiñeron con el anticuerpo policlonal Ab1 anti-ATP7B (canal FITC) y el monoclonal anti-MRP2 (canal Texas Red). Obsérvese la retención de ATP7B en el Golgi a bajas concentraciones de Cu<sup>2+</sup> intracelular, y su salida y aparición en vesículas y en el canalículo biliar tras añadir Cu<sup>2+</sup> al medio de cultivo. Barra 20μM.

A continuación, con el fin de confirmar la translocación de ATP7B a los canalículos biliares, realizamos y estudiamos cortes ópticos ortogonales en los canalículos biliares de las células Can10 incubadas 4h con 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>, y teñidas con los anticuerpos Ab1 y anti-ZO-1, este último como marcador de las *tight junctions* (TJs) que flanquean los canalículos biliares y separan los dominios apicales (membrana canalicular) y basolateral de la membrana plasmática.



**Figura 24 | Translocación del transportador de cobre ATP7B al canalículo biliar, en respuesta al incremento de la concentración de cobre intracelular.** Células Can10 crecidas durante 7 días fueron incubadas con 50 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> para estudiar a intervalos entre 2min y 4h los fenómenos de recolocalización de ATP7B que culminan con su incorporación a la membrana del canalículo biliar. Las células fueron teñidas con el anticuerpo Ab1 (canal verde, fluoresceína) y el anticuerpo anti-MRP2 (canal Texas Red) para teñir con éste, los canalículos biliares. En los paneles A-I se muestran las células estudiadas a los tiempos indicados después de la adición de CuCl<sub>2</sub>. En los paneles J-L se muestra también la presencia de ATP7B (canal FITC) en el compartimento subapical, rico en Rab11 (canal Texas Red). Barra 20.

En la figura 25, paneles A-C, puede observarse un canalículo biliar largo y ramificado con su membrana cargada de ATP7B, encuadrado en las *tight junctions*. En el panel D se muestra la suma de los cortes ópticos en el plano ortogonal marcado en el panel C (barra blanca), pudiendo apreciarse la localización apical de ATP7B y su inserción en la membrana canalicular flanqueada por las *tight junctions*.

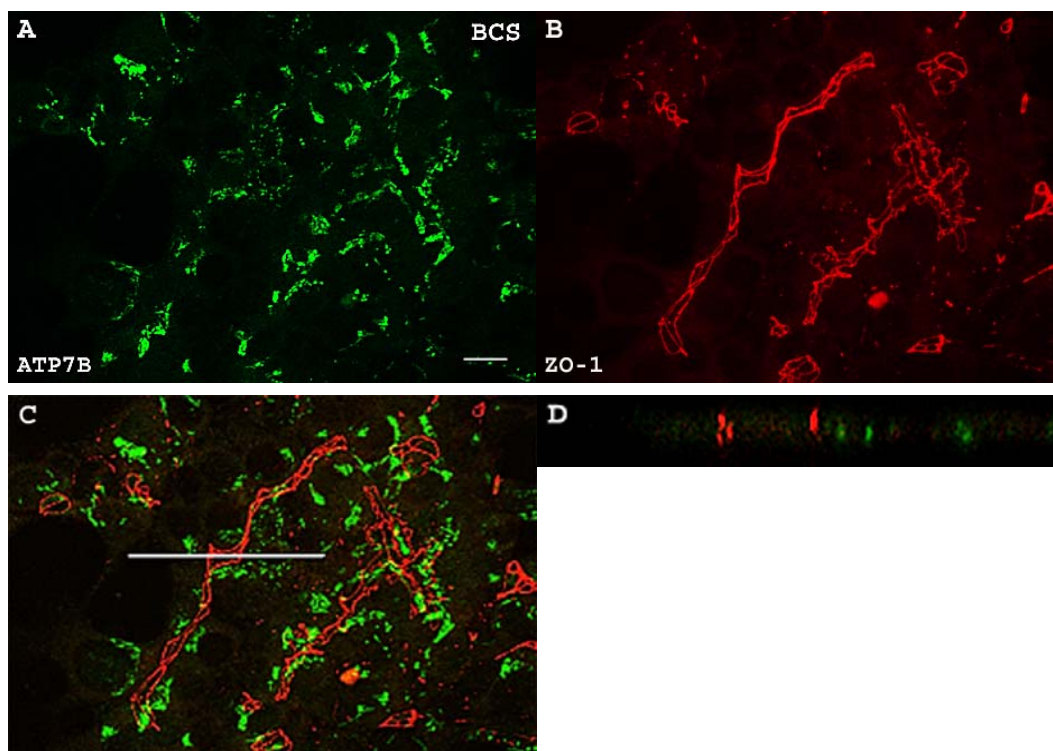


**Figura 25 | ATP7B es translocado a la membrana plasmática apical integrada en el canalículo biliar en células Can10, tras la elevación de los niveles celulares de cobre.** Las células Can10 mostrando largos y ramificados canalículos biliares, fueron tratadas con 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> durante 4h y posteriormente teñidas con los anticuerpos contra ATP7B (canal verde, fluoresceína) y la proteína de TJs, ZO-1 (canal rojo, Texas Red). Obsérvese en los paneles A y B, y en particular en el estudio de planos en el eje Z ortogonal, (panel C, línea blanca) la inserción y retención de ATP7B en la membrana canalicular. **TJs:** *tight junctions*. Barra: 20 $\mu$ M.

Por el contrario, cuando el estudio de ATP7B fue realizado en células tratadas con 200 $\mu$ M BCS y teñidas con los mismos anticuerpos pudimos observar un cuadro totalmente



diferente, consistente en la exclusión de ATP7B de la membrana canalicular y su retención en el aparato de Golgi (Figura 26).



**Figura 26 | ATP7B es excluido de la membrana canalicular en células Can10 cultivadas a bajos niveles de cobre.** Las células Can10 fueron tratadas con 200 $\mu$ M BCS durante 4h y posteriormente teñidas con anticuerpos específicos contra ATP7B (canal FITC) y la proteína ZO-1 de las TJs (canal Texas Red). El estudio general (paneles A y B) y en particular del plano Z del canaliculo biliar (panel D, línea blanca), muestra claramente la retención de ATP7B en el Golgi y su exclusión de los canaliculos biliares. TJs: *tight junctions*. Barra 20 $\mu$ M.

## II. Caracterización de las señales de retención y tráfico en ATP7B.

### 3. Estudio de los mutantes de ATP7B.

#### 3.1 Producción de los mutantes.

El transportador de cobre ATP7B y el de glucosa regulado por insulina GLUT4 comparten (como he mostrado en el apartado 1.8), su presencia en la TGN, mostrando ambos un tráfico regulado, en el caso de ATP7B por cobre, y en el caso de GLUT4 por insulina. Además, el análisis de las secuencias de ambos transportadores muestra la presencia de señales de transporte ya caracterizadas o potenciales que no pasan desapercibidas. Es por ello, y por el desconocimiento de los motivos implicados en la retención y transporte de ATP7B, que una parte de los resultados de esta tesis, recoge los estudios realizados con el ánimo de caracterizar dichas señales.

Con el fin de producir las mutaciones que creímos relevantes para el estudio de la retención intracelular y tráfico de ATP7B, se clonó el extremo carboxilo de la proteína en el vector *pT-Adv* (véase Materiales y Métodos). Los residuos a mutar se escogieron tras comparar las secuencias de ATP7B y GLUT4, y fueron: en su extremo carboxilo citoplasmático, el motivo dileucina D<sup>1450</sup>KXXLLL semejante al motivo dileucina RRXXXL<sup>489</sup>L de GLUT4 que opera en el transporte de la proteína desde la TGN al GSC y en su endocitosis; el cluster ácido carboxi-terminal D<sup>1460</sup>EEQCI, similar a los 5 últimos residuos ácidos (PDEND) de GLUT4 implicados junto con la Y<sup>502</sup>, en la retención éste. Y por otra parte, en el extremo amino terminal mutamos la secuencia FVQI semejante a la F<sup>5</sup>QQI contenida en el extremo amino de GLUT4 e implicada en el transporte del GLUT4 endocitado, desde la red endosomal al compartimento de retención perinuclear en la TGN (GSC<sup>1</sup>) (Palacios, Lalioti et al. 2001). Así pues, los mutantes desarrollados fueron los siguientes:

- Mutante W1<sup>1</sup> o Δ8, producido por delección de los 8 últimos residuos acídicos (<sup>1455</sup>DRDEEQCI) insertando delante del D<sup>1455</sup>, un codón de parada.
- Mutantes W2, W3, W4 en los que se substituyeron separadamente los residuos L<sup>1453</sup>, L<sup>1452</sup>, L<sup>1451</sup> por serinas (S).

- Mutante W5, producido por substitución del residuo K<sup>1448</sup>, por el residuo ácido glutámico (E).
- Mutante W6, en el que se substituyó el residuo aspártico, D<sup>1447</sup>, por el básico arginina (R).
- Mutante W10, producido por la substitución del residuo fenilalanina F<sup>493</sup>, por serina (S).

```

1   MDPKKNLASV GTMPEQERQV TAKEASRKIL SKLALPGRP W EQSMKQSF AF DNVGYEGGLD
61  STSSSPAATD VVNILGMTCH SCVKSIEDRI SSLKGIVNIK VSLEQ GKHTV RYVPSVMNLQ
121 QICLQIEDMG FEASAAEGKA ASWPSRSPA QEAVVKLRVE GMTCQSCVSS IEGKIRKLQG
181 VVRIKVSLSN QEAVITYQPY LIQPEDLRDH ICDMGFEAAI KNRTAPLRLG PIDVKNLEST
241 NLKKETVSPV QISNHFETLG HQGSYLATLP LRIDGMHCKS CVLNIEGNIG QLPGVQNIHV
301 SLENKTAQIQ YDPSCVTPMF LQTAIEALPP GHFKVSLPDG VEENEPQSGS SQRHQEQGPG
361 RTAVLTISGI TCASSVQPIE DMLSQRKGVQ QTSISLAEGT GAVLYDPSIV SLDELRTAVE
421 DMGFEVSVNS ETFTINPVRN FKSGNSVPQT MGDIAGSVQK MAPDTRGLPT HQGPGHSSET
481 PSSPGATASQ KCFVQIKGMT CASCVSNIER SLQRHAGILS VLVALMSGKA EVKYDPEIIQ
541 SPRIAQLIQD LGFEASVMED NTVSEGDIEL IITGMTCASC VHNIESKLTR TNGITYASVA
601 LATSKAHVKF DPEIVGPRDI IKIIEEIGFH ASLAQRNPNA HHLDHKTEIK QWKKSFCLCSL
661 VFGIPVMGLM VYMLIPSSTP QETMVL DHNI IPGLSVLNLI FFILCTFVQF LGGWYFYVQA
721 YKSLRHR SAN MDVLIVLAT T IAYAYSLVIL VVAVAEKAEK SPVTFFDTPP MLFVFIALGR
781 WLEHVAKSKT SEALAKLSL QATEATVVTL GEDNLILREE QVPMELVQRG DVIKVVPGGK
841 FPDVGKVLEG NTMADESLIT GEAMPVTKKP GSIVIAGSIN AHGSVLLKAT HVGNDTTLAQ
901 IVKLVEEAQM SKAPIQQ LAD RFSGYFVPFI IISTLT LVV WIVIGFVDFG VVQKYFPSPS
961 KHISQTEVII RFAFQTSITV LCIACPCSLG LATPTAVMVG TGVA AQNGVL IKGGKPLEMA
1021 HKIKTVMF DK TGTITHGVPR VMRFLLLADV ATLPLRKVLA VVGTA EASSE HPLGVAVTKY
1081 CKEELGTETL GYSTDFQAVP GCGISCKVSN VEGILARSDL TAHPVG VGNP PTGEGAGPQT
1141 FSVLIGNREW MRRNGLTISS DISDAMTDHE MKGQTAILVA IDGVL CGMIA IADAVKPEAA
1201 LAIYTLKSMG VDVALITGDN RKTARAIATQ VGINKVFAEV LP SHKVAKVQ ELQNEGKKVA
1261 MVGDGVNDSP ALAQADV GIA IGTGTDVAIE AADVVLIRND LLDVVASIHL SKRTVRRIRV
1321 NLVLALIYNM VGIP IAAGVF MPIGIVLQPW MGSAAMAASS VSVVLSSLQL KCYRKPDLER
1381 YEAQAHGRMK PLSASQVSVH IGMDDRRRDS PRATAWDQVS YVSQVSLSSL TSDRLSRHGG
1441 AAEDGG DKWS LLLSDRDEEQ CI

```

**Secuencia de aminoácidos del ATP7B de ratón.** En azul y subrayados se muestran los residuos mutados: en el extremo carboxilo de la proteína, el residuo aspártico D<sup>1447</sup>, la lisina K<sup>1448</sup>, las leucinas L<sup>1451</sup>, L<sup>1452</sup> y L<sup>1453</sup> y la delección del cluster ácido <sup>1455</sup>DRDEEQCI; en el extremo amino, la fenilalanina F<sup>493</sup>.

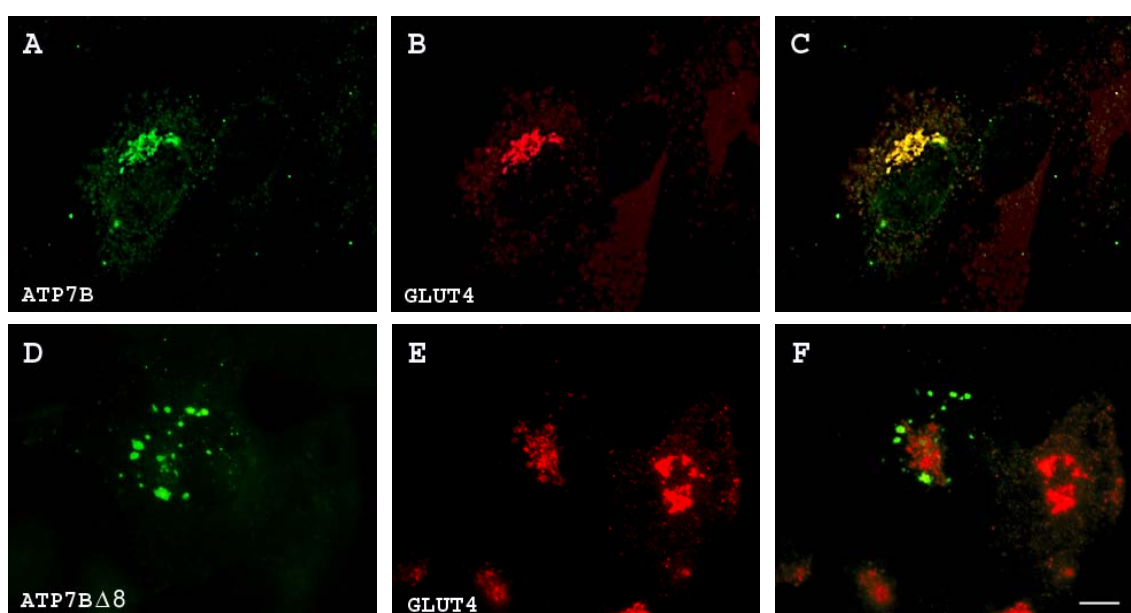
Una vez producidos los cDNAs y secuenciados para comprobar que tenían la mutación deseada, se clonó la secuencia completa de la proteína en el vector de expresión en mamíferos pCDNA 3.1 Myc-His (véase Materiales y Métodos).

Ya que el anticuerpo Ab1 producido contra el extremo amino de ATP7B, reconocía además de a éste, al transportador de cobre homólogo y ubicuo, ATP7A y la caracterización de

las señales de retención y distribución de ATP7B contenidas en su secuencia exigía transfectar células que expresaran ATP7A, decidimos producir un segundo anticuerpo contra secuencias específicas de ATP7B en rata y ratón que no se encuentran en ATP7A, al que llamamos Ab2 4P (4P acrónimo de 4 péptidos), y cuya caracterización describimos en el apartado 4.

### 3.2 Estudio del mutante ATP7B $\Delta$ 8 y su comparación con el mutante Glut4 $\Delta$ 5.

Los estudios de retención de GLUT4 en la TGN de fibroblastos 3T3-L1 y células COS-7, habían demostrado que el residuo Tyr<sup>502</sup> y los últimos 5 aa del transportador juegan un papel importante en la retención del transportador, ya que la delección de la secuencia DEND en su extremo carboxilo, impide su retención en el GSC y promueve su acumulación en vesículas dispersas por el citoplasma correspondientes a lisosomas (Martinez-Arca, Lalioti et al. 2000). Estos resultados y el carácter ácido del extremo carboxilo de ATP7B, nos llevó a estudiar si la delección de sus últimos 8 residuos (D<sup>1455</sup>RDEEQCI) afectaba también su retención en la TGN.



**Figura 27 | El mutante ATP7B $\Delta$ 8 no es retenido en la TGN de fibroblastos 3T3L1 que expresan GLUT4.** Los cDNAs del ATP7B silvestre (paneles A-C) y del ATP7B $\Delta$ 8 (paneles D-F) fueron transfectados separadamente en fibroblastos 3T3L1-GLUT4. Una vez fijadas las células, se tiñeron con el anticuerpo policlonal Ab2 4P anti-ATP7B (canal FITC) y el monoclonal 1F8 anti-GLUT4 (canal Texas Red). Obsérvese como la delección del cluster ácido en ATP7B $\Delta$ 8, impide su retención en el mismo compartimento que aloja a GLUT4 y al ATP7B silvestre. Barra 20 $\mu$ M.



Para estudiar el mutante ATP7B $\Delta$ 8, transfectamos de forma transitoria el clon de fibroblastos 3T3L1 que expresaban establemente GLUT4, con los cDNAs del ATP7B silvestre y ATP7B $\Delta$ 8. Transcurridas 18 horas estudiamos por microscopia óptica la localización de ATP7B y ATP7B $\Delta$ 8, comparándola con la distribución GLUT4. Como era de esperar observamos como el ATP7B silvestre era retenido en el mismo compartimento que GLUT4 (Figura 27, A-C), mientras que el mutante ATP7B $\Delta$ 8 aparecía en vesículas dispersas por el citoplasma (Figura 27, D-F).

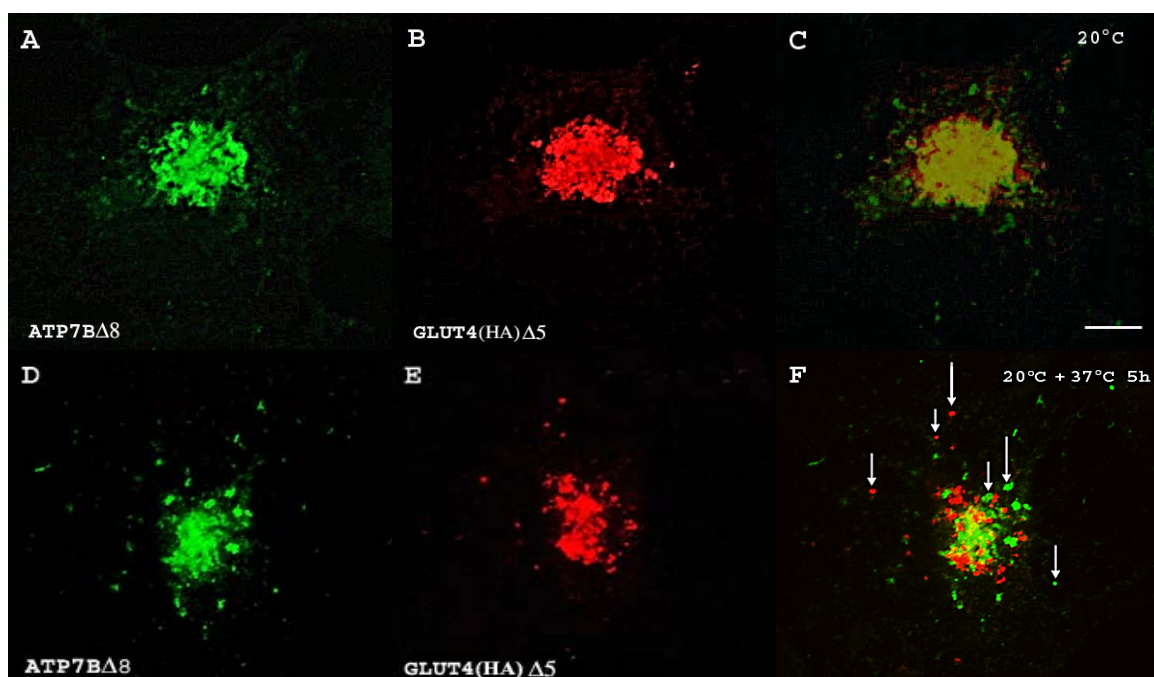
Los resultados obtenidos con el mutante ATP7B $\Delta$ 8 nos indujeron a caracterizar las vesículas en las que era retenido. En concreto, deseábamos saber si éstas eran post-Golgi y si ATP7B $\Delta$ 8 y GLUT4 (HA) $\Delta$ 5 se encontraban en las mismas o en diferentes vesículas. Para ello, transfectamos las células COS-7 con los cDNAs de los dos mutantes. Transcurridas 18 horas de la transfección a 37°C, y tras incubar las células 3h con 10 $\mu$ M cicloheximida para limpiar la vía secretora, éstas fueron incubadas 3h más a 20° C con el fin de bloquear la salida de proteínas transportadas a través de la vía secretora de la TGN (Saraste, Palade et al. 1986), y posteriormente estudiadas por microscopía de inmunofluorescencia o incubadas 5h más a 37° C para desbloquear la vía secretora antes de su estudio. Esta estrategia fue la misma que la empleada anteriormente en los estudios de Glut4 $\Delta$ 5 (Martinez-Arca, Lalioti et al. 2000).

En la Figura 28, paneles A y B puede observarse como los dos mutantes ATP7B $\Delta$ 8 y GLUT4 (HA) $\Delta$ 5 eran retenidos en la TGN tras incubar las células a 20°C, y transportados a vesículas distintas tras ser aumentada la temperatura a 37° C y desbloquearse la salida de proteínas de la TGN (Figura 28, D-F).

### 3.3 Estudio de la señal dileucina del transportador de cobre ATP7B.

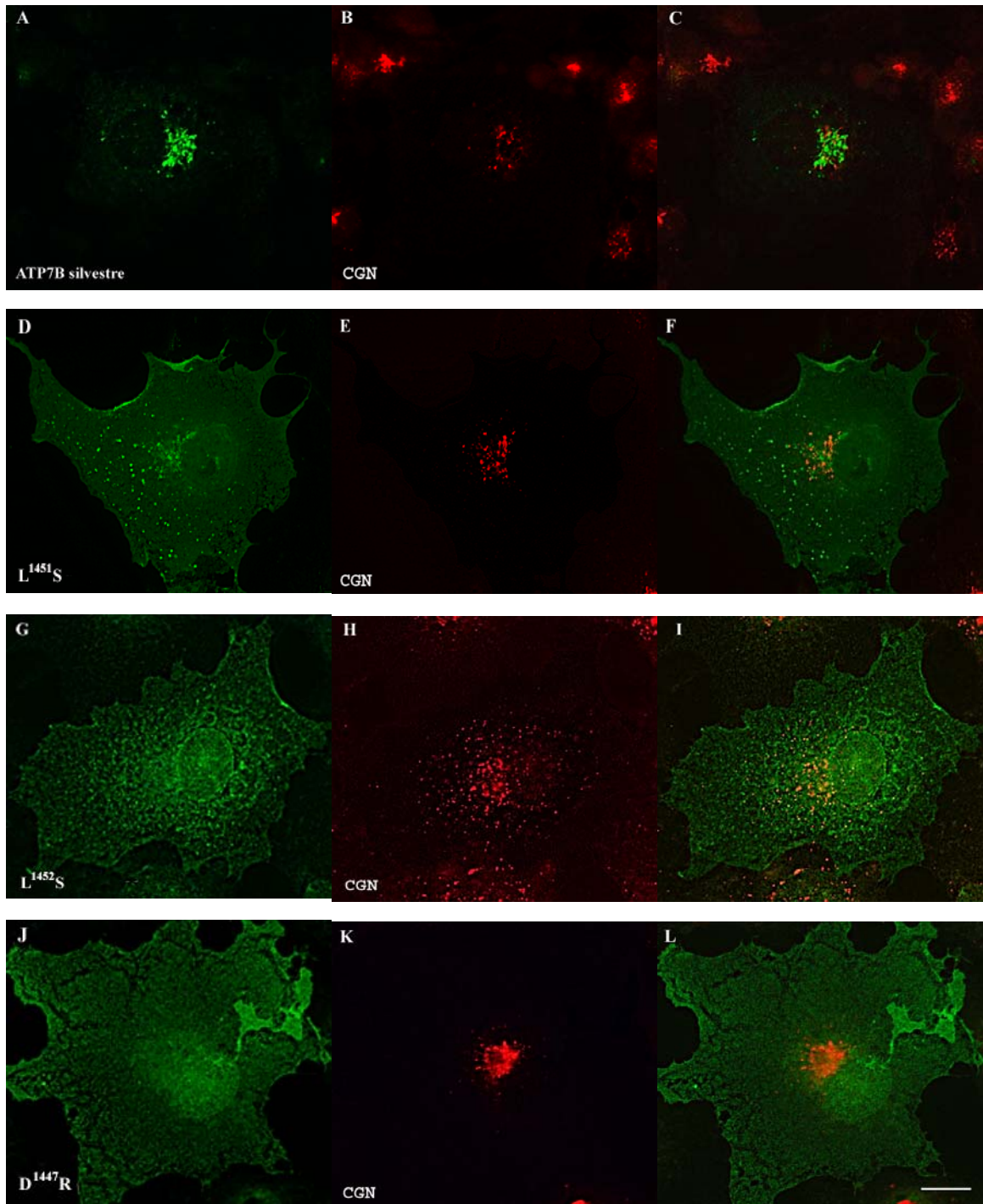
Se ha descrito que los motivos dileucina presentes en la colas citoplasmáticas de algunas proteínas de membrana están implicados en su transporte desde la red *trans* del Golgi a la membrana plasmática y a endosomas secundarios de la vía lisosomal (Johnson and Kornfeld 1992; Letourneur and Klausner 1992; Sandoval, Arredondo et al. 1994). No obstante, los determinantes estructurales que los componen no han sido del todo caracterizados. Se sabe que del par dileucina, la primera leucina es imprescindible para que el motivo funcione, mientras que la segunda puede ser substituida por isoleucina, valina o metionina sin afectar su habilidad transportadora. Además, se ha demostrado que los residuos ácidos localizados en las posiciones -4 y -5 con respecto a la primera leucina, están implicados en la internalización de la cadena invariante Ii del complejo mayor de histocompatibilidad, de quimeras de CD4 en células de

mamífero y en el transporte de la proteína t-SNARE Vamp3 hacia las vacuolas, en levaduras (Darsow, Burd et al. 1998).



**Figura 28 | ATP7B $\Delta$ 8 y GLUT4 (HA)  $\Delta$ 5 son retenidos en la TGN de células COS-7 incubadas a 20° C, y son transportados a vesículas diferentes tras ser aumentada la temperatura a 37° C y reanudarse el tráfico a través de la vía secretora.** Células COS-7 cotransfectadas con los cDNAs ATP7B $\Delta$ 8 y GLUT4 (HA)  $\Delta$ 5 durante 18h, fueron incubadas 3h a 20° C (paneles A-C) bloqueando así la salida de las proteínas del Golgi y posteriormente se reestableció el tráfico incubando las células a 37° C durante 5h (paneles D-F). Las células fueron teñidas con el anticuerpo policlonal Ab2 4P anti-ATP7B (canal FITC) y el monoclonal 16B12, anti-HA para teñir el GLUT4 (HA) $\Delta$ 5 (canal Texas Red). Las flechas indican las vesículas que contienen al ATP7B $\Delta$ 8 y como puede observarse en el panel F (superposición de canales) son distintas de las que contienen al GLUT4 (HA)  $\Delta$ 5. Barra 20 $\mu$ M.

El motivo dileucina en ATP7B, <sup>1447</sup>DKXXLLL<sup>1453</sup>, se caracteriza por tener en las posiciones -3 y -4 un residuo básico (K, lisina) y otro ácido (D, aspártico), respectivamente. Su estudio realizado por el grupo de Mercer en células CHO-K1 transfectadas, ha demostrado que la substitución de las tres leucinas (LLL<sup>1451-1453</sup>), localizadas en el dominio carboxilo citoplásmico terminal de ATP7B, por alaninas impedía su reciclamiento a la TGN, siendo retenido en vesículas citosólicas (Cater, La Fontaine et al. 2006). El resultado en cuanto a la incapacidad de reciclamiento de la proteína, coincide con el obtenido en el estudio del transportador de cobre ubícuo ATP7A, en el cual, la mutación del correspondiente motivo



**Figura 29 | Células COS-7 transfectadas con los cDNAs portadores de las mutaciones que afectan a la señal dileucina de ATP7B.** En los paneles A, D, G y J se muestran células transfectadas con el ATP7B silvestre y los mutantes L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S, D<sup>1447</sup>R. En los paneles B, E, H y K se muestra la localización del Golgi teñido con el anticuerpo anti-gp74 (CGN) para subrayar la escasa retención de los mutantes en él, mostrándose la superposición de las dos tinciones en los paneles C, F, I y L. Puede observarse como los tres mutantes se localizan masivamente en la membrana plasmática de la célula indicando que las mutaciones introducidas pueden impedir el reciclamiento de la proteína desde la membrana plasmática hasta la TGN. Barra 20µM.

dileucina (LL<sup>1487-1488</sup>) impide su reciclamiento desde la membrana plasmática hasta la TGN (Petrís and Mercer 1999).

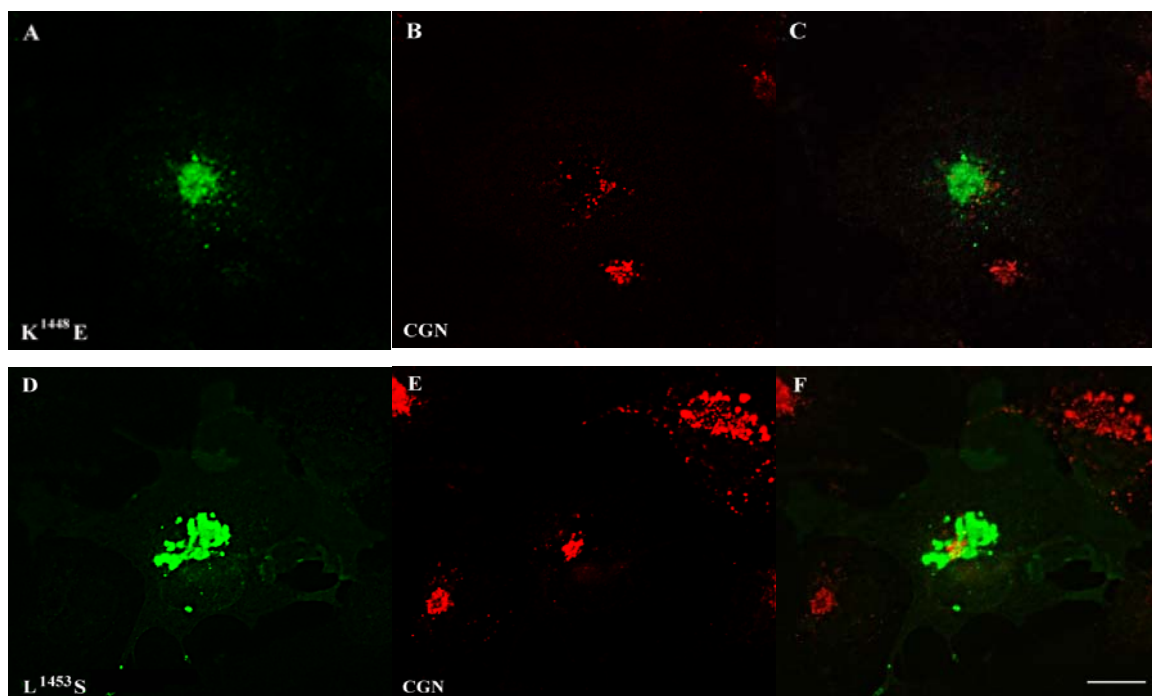
Para completar el estudio del motivo dileucina de ATP7B, concretamente el hecho de que constara de tres residuos leucina (L) y mostrara apareados en las posiciones -3 y -4, un residuo básico, K, y otro ácido, D, produjimos los distintos mutantes y transfectamos los cDNAs resultantes en células COS-7 durante 18 horas. Posteriormente teñimos las células con el anticuerpo policlonal Ab2 4P anti-ATP7B y el monoclonal anti-gp74, el único que reaccionaba en estas células, para marcar la posición del Golgi (CGN) y procedimos a su estudio.

En la figura 29 se muestra la localización perinuclear del ATP7B silvestre (Figura 29, A-C) y como las mutaciones de las leucinas L<sup>1451</sup>S (paneles D-F), L<sup>1452</sup>S (paneles G-I), y del aspártico D<sup>1447</sup>R (paneles J-L), impedían el reciclamiento de la proteína desde la membrana plasmática a la TGN.

Por otra parte, las mutaciones producidas en los residuos K<sup>1448</sup>E y L<sup>1453</sup>S, impidieron la llegada de ATP7B a la membrana plasmática secuestrando la proteína en la TGN y en vesículas en el caso del mutante K<sup>1448</sup>E (Figura 30, paneles A-C), o un compartimento vesicular que suponemos posterior a la TGN en el caso del mutante L<sup>1453</sup>S (Figura 30, D-F).

### **3.4 Estudio del efecto de las variaciones intracelulares de cobre sobre los mutantes ATP7BΔ8, K<sup>1448</sup>E, L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S, D<sup>1447</sup>R, L<sup>1453</sup>S, en células COS-7 transfectadas.**

Para realizar el estudio del efecto de las mutaciones introducidas sobre la distribución de las proteínas mutadas, se requería evitar su retención en los distintos puntos de sus vías de transporte y en el caso de las proteínas transportadas a través de la vía secretora, prevenir su sobreexpresión y acumulación en la membrana plasmática. Para solventar el primer problema, incubamos las células con el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida, durante las últimas 3 horas de la transfección; y para evitar la sobreexpresión, realizamos experimentos pilotos con el objeto de trabajar con tiempos de transfección en los que la proteína estudiada no es sobreexpresada. Hecho esto, estudiamos la proteína silvestre y sus mutantes en células COS-7 transfectadas 15 horas e incubadas las 3 últimas horas de la transfección con 10μM cicloheximida. Una vez fijadas las células fueron teñidas con el anticuerpo policlonal Ab24P anti-ATP7B y que no reaccionaba con el ATP7A endógeno de las células, y el monoclonal anti-gp74 para situar el aparato de Golgi.

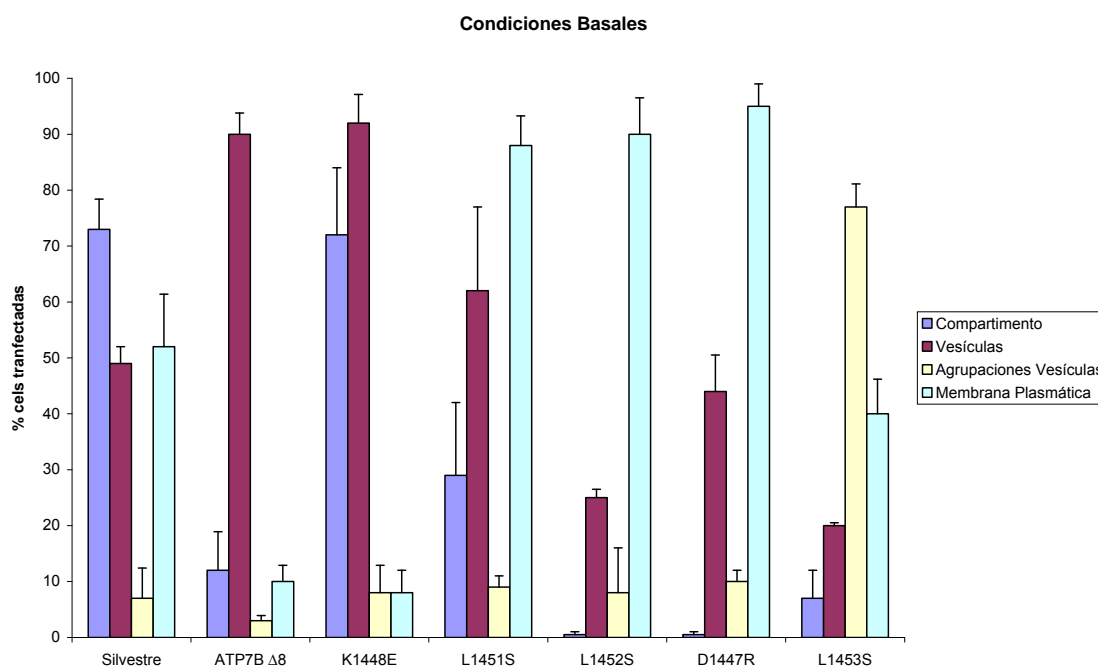


**Figura 30 | Las mutaciones producidas en los residuos K<sup>1448</sup>E L<sup>1453</sup>S impiden la llegada de ATP7B a la membrana plasmática.** Células COS-7 transfectadas con los cDNAs correspondientes a los mutantes K<sup>1448</sup>E y L<sup>1453</sup>S fueron teñidas con el anticuerpo policlonal Ab2 4P anti-ATP7B (canal FITC) y el monoclonal anti-gp74 marcador del cis-Golgi (CGN) (canal Texas Red). Como puede observarse en los paneles A y D las mutaciones de la K<sup>1448</sup>E y L<sup>1453</sup>S, provocan la retención de la proteína en la TGN y en un compartimento con apariencia vesicular, respectivamente.

Los resultados que describimos a continuación, provienen del cómputo de las células transfectadas de tres experimentos independientes, y los fenotipos fueron clasificados según la proteína se localizaba en la TGN, vesículas citoplasmáticas, agrupaciones vesiculares, o membrana plasmática.

En el histograma de la figura 31, puede observarse en las células COS-7 transfectadas e incubadas en condiciones fisiológicas, el ATP7B silvestre localizado en la TGN (en un 73% de las células computadas), en la membrana plasmática (52%) y en vesículas (49%). En contraposición, el mutante  $\Delta 8$ , se localizó mayoritariamente en vesículas citoplasmáticas (90%).

La substitución de la lisina situada en la señal dileucina de la cola carboxilo de la proteína, K<sup>1448</sup>E, impidió la llegada de ATP7B a la membrana plasmática, provocando su retención en el compartimento (72%) y en vesículas (92%). Por otra parte, las mutaciones en los residuos L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S y D<sup>1447</sup>R, interfirieron con el reciclamiento de la proteína y como resultado, los porcentajes de células que la presentaron en su membrana plasmática aumentaron de un 52% para la proteína silvestre a un 88%, 90% y 95% para los mutantes L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S y D<sup>1447</sup>R, respectivamente. Este resultado coincidía con los estudios realizados con el transportador de cobre ATP7A, que demostraban que la señal dileucina situada en su extremo carboxilo (L<sup>1487</sup>-L<sup>1488</sup>) mediaba su endocitosis y transporte a endosomas de reciclamiento (Francis, Jones et al. 1999). Por último, la mutación de la leucina L<sup>1453</sup>S, resultó en la retención de la proteína en agrupaciones vesiculares en un 77% de las células computadas, la disminución de su retención en la TGN (7%), sin producir por otra parte, una bajada en la frecuencia con que encontramos la proteína mutada en la membrana plasmática (40% L<sup>1453</sup>S frente a 50% ATP7B silvestre), lo que sugería que estas agrupaciones vesiculares pudieran tratarse de un compartimento de reciclamiento semejante al ARE presente en células polarizadas (hepatocito) y por lo tanto, que la L<sup>1453</sup> estuviera implicada en el transporte de ATP7B desde éste a la TGN.



**Figura 31** | Histograma donde se representan las diferencias en la localización entre el ATP7B silvestre y sus mutantes, en células COS-7 transfectadas durante 15 horas en medio sin adiciones.

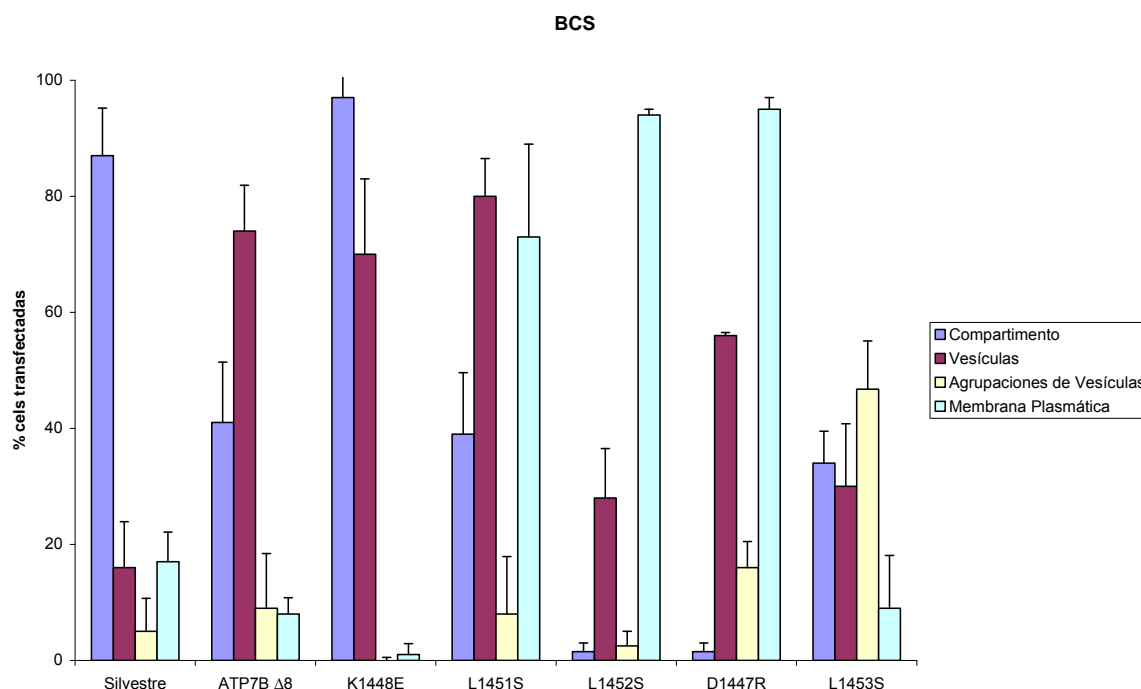


El siguiente paso en la caracterización de las señales, fue comprobar si la incubación con BCS y cobre de las células COS-7 transfectadas, afectaba el comportamiento de dichos mutantes. Primero estudiamos si al igual que sucedía con el ATP7B silvestre la BCS, aumentaba la retención de los mutantes en la TGN. Para ello, tratamos las células COS-7 con 200 $\mu$ M BCS 4 horas después de la transfección (ya que habíamos comprobado *a priori* que la expresión de la proteína se iniciaba 6 horas después de ésta), y la mantuvimos durante las 15 horas de expresión de la proteína. Los resultados obtenidos tras el cómputo de las células se muestran en la figura 32.

Puede observarse, como al añadir la BCS, la retención del ATP7B silvestre en el compartimento aumentó de un 73% (medio DMEM completo sin adiciones) hasta un 87% (medio DMEM completo + BCS), pero el cambio más perceptible resultó ser a nivel de su localización en las vesículas y en la membrana plasmática, ya que bajó de un 49% y 52% (condiciones fisiológicas), hasta un 16% y 17% respectivamente, tras el tratamiento con la BCS.

Con el mutante ATP7BA8 se observó un aumento de 3,4 veces en su retención en el compartimento (del 12% al 41%) y una disminución a nivel de su presencia en las vesículas (92% en condiciones fisiológicas frente a un 74% en medio con BCS); no se observaron cambios representativos a nivel de la membrana plasmática. Con el mutante K<sup>1448</sup>E, se detectó un aumento de las células que mostraban la proteína retenida en el compartimento (de un 72% en condiciones basales, a un 97% con BCS) y una pequeña disminución en su presencia en vesículas (de un 92% a un 70%). Las mutaciones en los residuos L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S y D<sup>1447</sup>R no produjeron cambios significativos en la retención de la proteína en la TGN tras el tratamiento con la BCS, lo que confirmaba nuevamente que estas mutaciones impedían el reciclamiento de la proteína desde la membrana plasmática a la TGN. Sin embargo, con respecto al mutante L<sup>1453</sup>S, observamos un aumento en su retención en la TGN de un 7% en condiciones fisiológicas a un 34% en medio con BCS, y una disminución en las agrupaciones vesiculares de un 77% a un 47% sugiriendo pues, que la L<sup>1453</sup>, no interviene en el retorno de ATP7B desde las agrupaciones vesiculares a la TGN.

Repetimos el experimento añadiendo esta vez la BCS, en lugar de a las 4 horas, después de las 15 horas de transfección, pero no observamos diferencias en la localización del ATP7B silvestre y en los mutantes con respecto a los datos ya presentados.



**Figura 32 |** Histograma que resume las diferencias entre la localización del ATP7B silvestre y sus mutantes en las células COS-7 transfectadas en presencia de 200μM BCS.

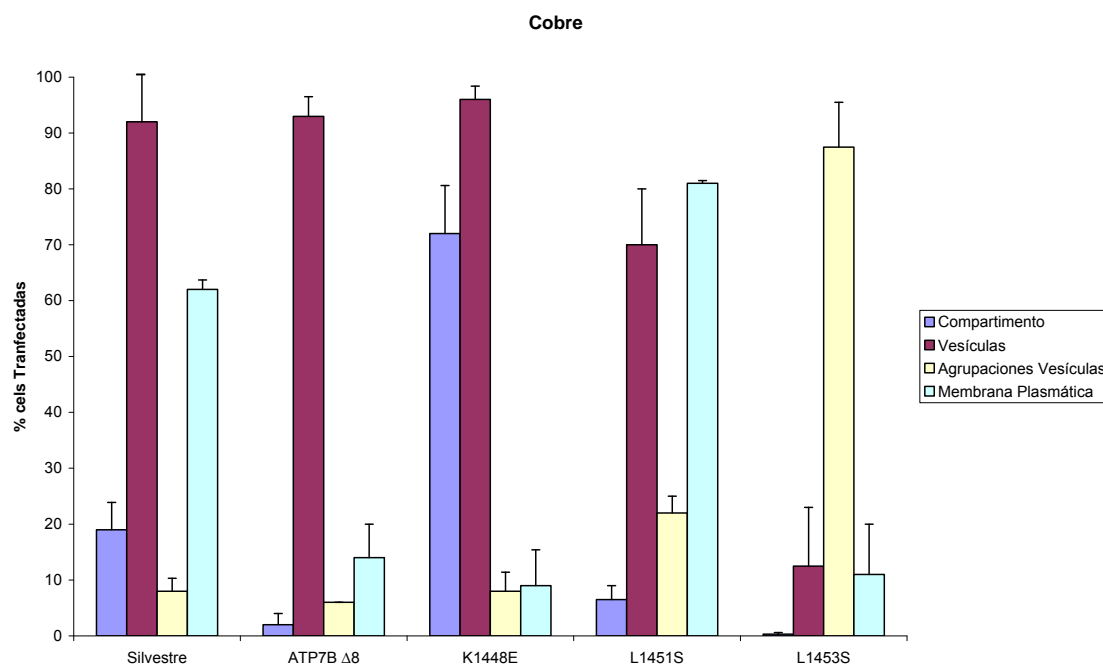
A continuación, comprobamos el efecto del cobre sobre la localización del ATP7B silvestre y de los mutantes, incubando las células con 200μM CuCl<sub>2</sub> durante 4 horas después de su transfección. Pudimos observar como tras el tratamiento con el cobre, el ATP7B silvestre fue translocado fuera la TGN, disminuyendo el número de células que lo presentan retenido en ella de un 73% en condiciones fisiológicas, a un 19% en medio con cobre. También resultó significativo el aumento de células que presentaban la proteína en vesículas (incrementando su porcentaje de un 49% a un 92%), pero no siendo tan evidente en la membrana plasmática, que aumentó de un 52% en medio DMEM sin adiciones a un 62% tras el tratamiento con el metal, sugiriendo que éste es esencial en la salida de ATP7B de la TGN y su ingreso en vesículas (Figura 33).

En cuanto al efecto del tratamiento del cobre sobre la distribución de los mutantes, los resultados más llamativos se obtuvieron con el mutante K<sup>1448</sup>E, ya que a diferencia del ATP7B silvestre, el aumento intracelular de los niveles del metal no afectó a su retención en la TGN, lo que sugería que el residuo K<sup>1448</sup> era crítico para la salida de ATP7B de la TGN en respuesta al cobre. Por otra parte, la mutación en el residuo L<sup>1453</sup>S permitió la salida de la proteína de la



TGN, provocando un leve aumento de su localización en vesículas ( de un 62% a un 70%) y en agrupaciones vesiculares (de un 77 a un 87,5%) y disminuyendo la retención de la proteína en la membrana plasmática (de un 40% en condiciones basales a un 9%), lo que indicaba un posible papel de la L<sup>1453</sup> tanto en la salida de las agrupaciones vesiculares hasta la membrana plasmática así como en su reciclamiento desde ésta a las vesículas. Con los mutantes ATP7B $\Delta$ 8 y L<sup>1451</sup>S tan sólo se registraron cambios a nivel de la salida de la TGN, que pasaba de un 12% en condiciones fisiológicas a un 2% en el ATP7B $\Delta$ 8, y, de un 29% a un 6,5% el mutante L<sup>1451</sup>S, indicando que estos residuos no son críticos en la translocación de ATP7B de la TGN, en respuesta al aumento de cobre intracelular.

La incubación de las células con CuCl<sub>2</sub> durante las 15 horas de transfección no resultó en diferencias con respecto a los resultados anteriormente citados.



**Figura 33 |** Histograma representando las diferencias en la localización del ATP7B silvestre y sus mutantes, en las células COS-7 transfectadas durante 15 horas, y las 4 últimas en presencia de 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>.

### III. Una nueva localización de ATP7B en el hepatocito.

#### 4. ATP7B se asocia de manera estable a las “tight junctions”.

##### 4.1 Desarrollo del anticuerpo Ab2 4P.

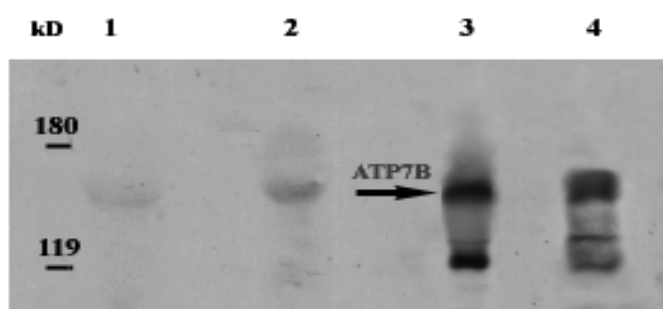
Para la producción del anticuerpo Ab2 4P, se sintetizaron 4 péptidos correspondientes a las secuencias aa 953-967, aa 342-362, aa 1404-1428 y aa 1429-1461, secuencias que cumplían los anteriores requisitos (ver Materiales y Métodos). La caracterización del anticuerpo Ab2 4P se centró en su reacción con ATP7B y su especificidad en el reconocimiento de los péptidos contra los que fue desarrollado. En todos los estudios que se describen a continuación, siempre empleamos el anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad (véase apartado de Materiales y Métodos).

El estudio de la reacción de Ab2 4P con los péptidos antigénicos mediante el test ELISA indicó que el anticuerpo reaccionaba fuertemente con el péptido p953-967 localizado en el tercer bucle exofacial que une los segmentos transmembrana 5 y 6, bastante menos con los péptidos p1404-1428 y p1429-1461 localizados en el extremo C-citoplasmático de la proteína, y nada con el péptido p342-362 localizado en el extremo N- de ésta.

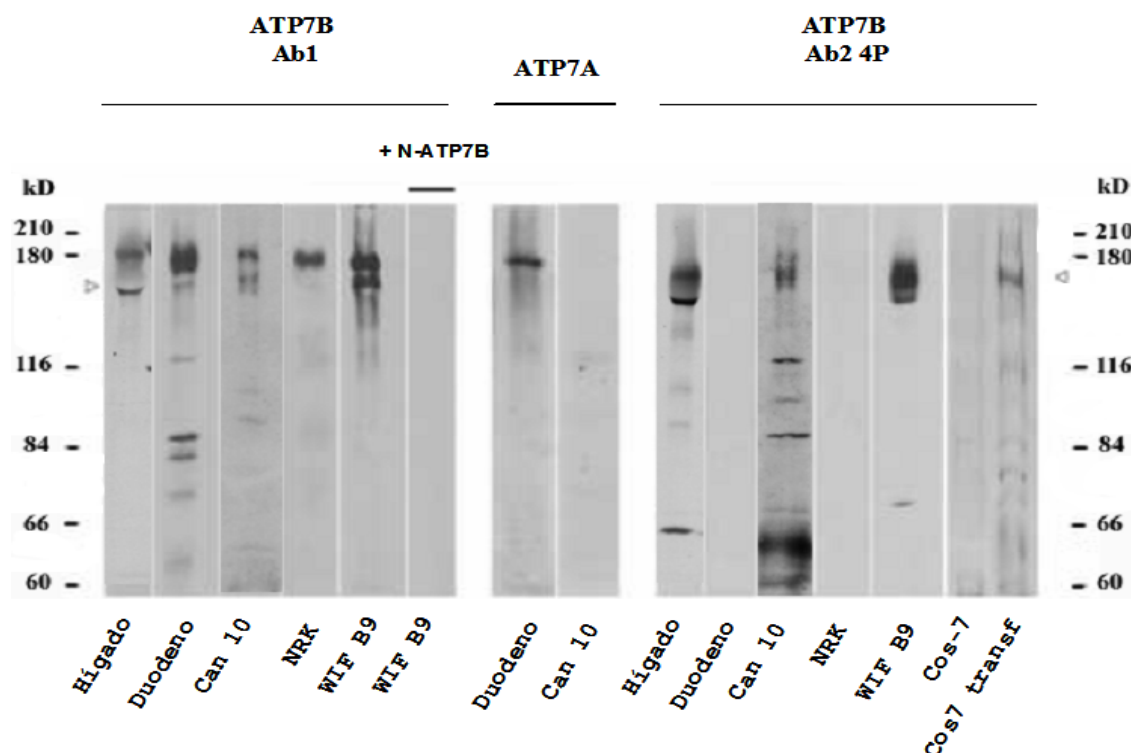
El estudio de la reactividad de Ab2 4P con ATP7B realizado por Western Blot se muestra en la figura 34. Puede observarse en el carril 3, como en el extracto de membranas totales de hígado de rata, tratadas con 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5 para eliminar las proteínas solubles y periféricas, el anticuerpo reconoció un polipéptido de 165kD que coincidía con la masa molecular de ATP7B (Schaefer y col. 1999). Además, la fuerte inhibición de la reacción del anticuerpo con la proteína de 165kD, tras preincubar éste con los péptidos utilizados en su obtención (carril 1) y, en particular, con el péptido más inmunogénico p953-967 (carril 2), confirmó que la reacción del anticuerpo Ab2 4P con ATP7B era específica. Por el contrario, en un segundo control en el que el anticuerpo fue incubado con un péptido contenido exclusivamente en el transportador de cobre ATP7A, la preincubación no provocó el bloqueo de su reacción con ATP7B. Todos estos resultados demostraron, pues, que el anticuerpo Ab2 4P reaccionaba específicamente con ATP7B.

## 4.2 Estudio por Western de la reactividad de los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P con ATP7B.

A continuación estudiamos si existían diferencias en cuanto a la reactividad de los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P con ATP7B, en distintos extractos y membranas de tejidos y líneas celulares que expresaban ATP7B, ATP7A o ambos. Como puede observarse en la figura 35, ambos anticuerpos reaccionaron con la proteína de masa molecular 165kD que corresponde a ATP7B (►) en hígado de rata y en extractos de células Can10 y WIF-B9. Por otra parte, el anticuerpo Ab1, reaccionó también con un polipéptido de 180kD en tejidos y células que no expresaban ATP7B, como el duodeno y células NRK, que coincidía con la masa molecular de ATP7A. Sin embargo esta reacción con la proteína de 180kD no fue observada con el anticuerpo Ab2 4P, lo que demostró que mientras que el anticuerpo Ab2 4P reaccionaba específicamente con ATP7B, el anticuerpo Ab1 reconocía también a ATP7A.



**Figura 34 | El anticuerpo Ab2 4P reacciona específicamente con el transportador de cobre, ATP7B expresado en hígado.** Cada carril del gel se cargó con 50µg de membranas totales de hígado de rata tratadas con 0,1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El estudio por Western Blot, muestra la reacción del anticuerpo con una proteína de 165kD que corresponde a ATP7B (carril 3, flecha negra). Además, el anticuerpo reacciona con una proteína de 119kD, que por no ser detectada siempre en las preparaciones de membranas de hígado, podría ser un producto de degradación. En el carril 1, puede observarse como la reacción es fuertemente inhibida tras incubar el anticuerpo con los péptidos utilizados en su inmunización o con 20µg del péptido más inmunogénico p953-967 (carril 2). Finalmente, en el carril 4 se muestra como la preabsorción del anticuerpo con 20µg de un péptido contenido en la secuencia de ATP7A no inhibió la reacción.

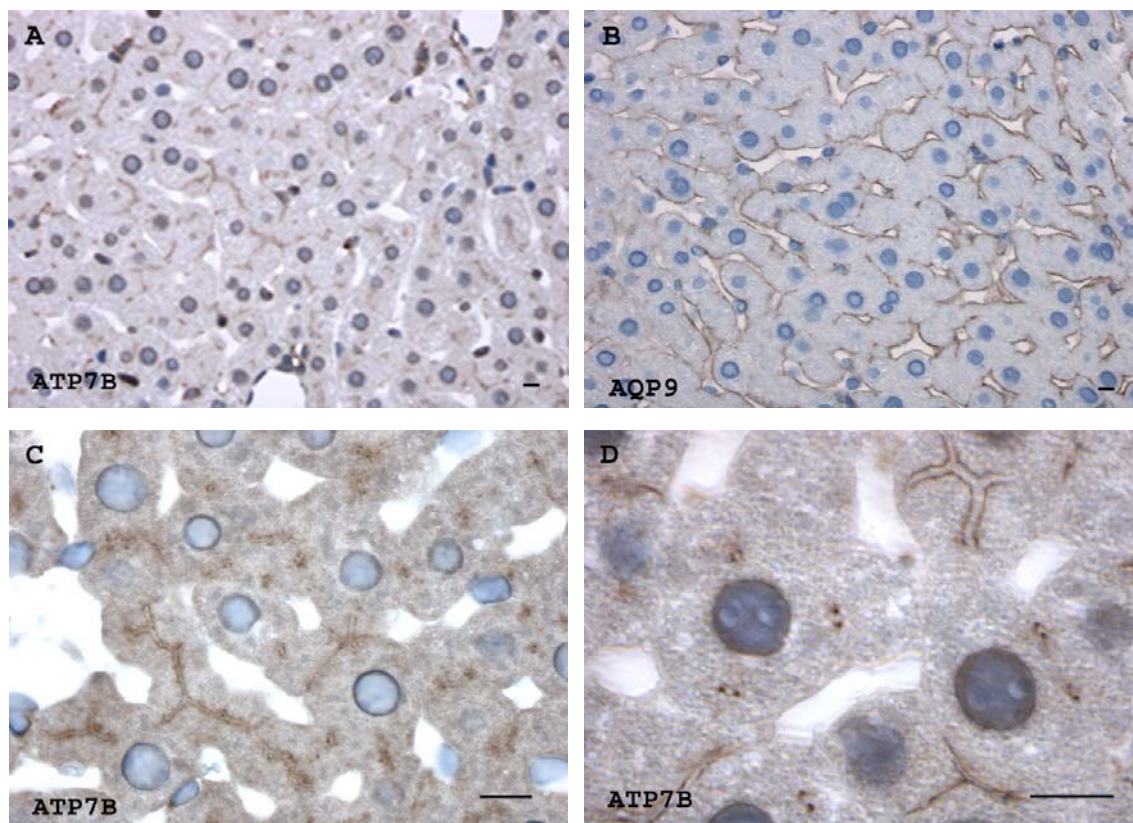


**Figura 35 | Estudio de la reacción de los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P con ATP7B.** Sometimes membranas posnucleares (100µg de tejido y células que expresaban y no expresaban ATP7B) a su estudio por Western Blot y ensayamos la reactividad de los dos anticuerpos producidos contra ATP7B (Ab1 y Ab2 4P) y un anticuerpo que detecta ATP7A. Obsérvese como el anticuerpo Ab1, reacciona tanto con ATP7B (■) como con una proteína de 180kD que se encuentra en el duodeno y células NRK que no expresan ATP7B, y que esta reacción es específica porque desaparece al preabsorber el anticuerpo con el extremo N terminal de ATP7B. Sin embargo, el anticuerpo Ab2 4P reacciona únicamente con ATP7B en tejidos como hígado, y células Can10, células WIF-B9 y células Cos7 transfectadas que lo expresan.

#### 4.3 Estudio inmunohistoquímico de ATP7B en secciones de hígado de rata.

Para estudiar la distribución de ATP7B en el hígado de rata, incubamos secciones de 2µm de tejido, con el anticuerpo Ab2 4P (véanse Materiales y Métodos), empleando para su detección un segundo anticuerpo conjugado a HRP. En la figura 36, puede observarse como ATP7B se localiza en el dominio apical de la membrana plasmática de los hepatocitos que forman los canalículos biliares (Figura 36 panel A), distinguiéndose claramente del dominio teñido con un anticuerpo contra la acuagliceroporina AQP9, proteína que se localiza en la membrana basolateral que delimita los sinusoides hepáticos (Figura 36 panel B) (Elkjaer, Vajda

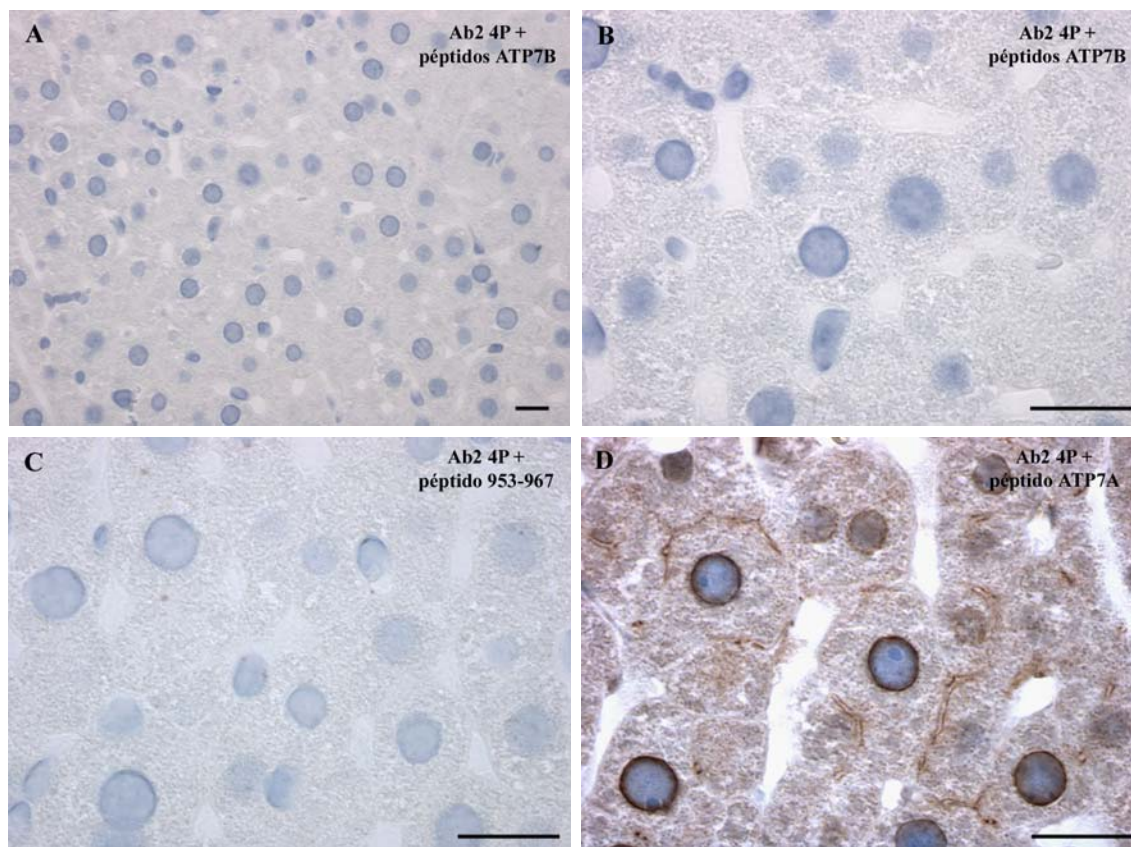
et al. 2000). Pudimos observar a mayor magnificación (Figura 36 paneles C y D) como en los cortes transversales de los canalículos biliares, el anticuerpo Ab2 4P teñía un par de puntos enfrentados, mientras que en secciones longitudinales aparecía dibujando el árbol biliar. Estos dos patrones de tinción y sobre todo la tinción puntual en vez de circular coincidía con el patrón de tinción descrito en la literatura para el marcador de las *tight junctions*, ZO-1 (Stevenson, Siliciano et al. 1986), por lo que estos resultados sugerían, que una población significativa de ATP7B podría localizarse en las *tight junctions*.



**Figura 36 | Localización del transportador de cobre, ATP7B, en las *tight junctions* de hígado de rata.** La reacción de la peroxidasa reveló que el anticuerpo ATP7B se concentra en el dominio apical de la membrana plasmática de los hepatocitos (panel A); es excluido del dominio basolateral rico en acuagliceroporina AQP9 (panel B); y se localiza en las *tight junctions* (panel C: cortes longitudinales; panel D: cortes transversales).

Por ser la primera vez que se describía la localización de ATP7B en las *tight junctions*; para descartar que se tratase de una tinción inespecífica del anticuerpo policlonal, procedimos a estudiar la tinción después de preabsorber el anticuerpo Ab2 4P con los péptidos utilizados en su obtención. El estudio incluyó la preincubación separada del anticuerpo con el péptido más inmunógeno p953-967, con la mezcla de los cuatro péptidos y con un péptido perteneciente a ATP7A como control negativo.



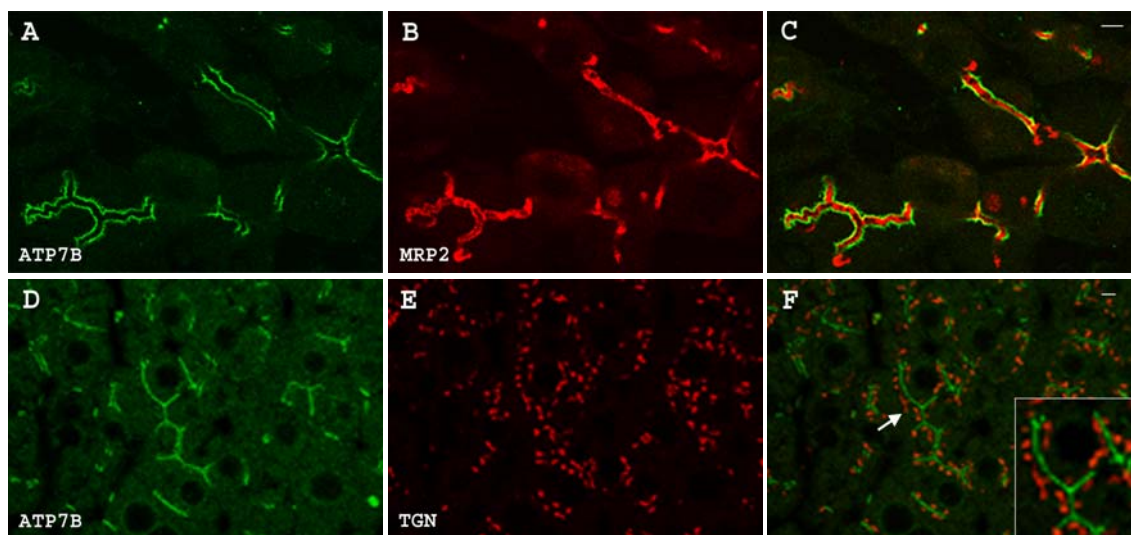


**Figura 37 |** Inmunohistoquímica de secciones de hígado de rata teñidas con el anticuerpo AB2 4P preabsorbido con los péptidos utilizados para su producción. (A-B). Preabsorción del anticuerpo anti-ATP7B con la mezcla de los 4 péptidos sintetizados para la inmunización; (C). Preabsorción del anticuerpo anti-ATP7B con el péptido más inmunógeno (p937-967). (D). Preabsorción del anticuerpo con un péptido perteneciente a ATP7A. Barras 20µm

Como puede observarse en la figura 37, el anticuerpo preabsorbido con el péptido p953-967 (Figura 37 panel C) o con la mezcla de los cuatro péptidos (Figura 37 paneles A y B), no reaccionó con las *tight junctions*, mientras que el péptido perteneciente a ATP7A no bloqueó la reacción del anticuerpo con ellas (Figura 37 panel D).

Para confirmar que la estructura en la que localizábamos a ATP7B en el hígado de rata se trataba de las *tight junctions* y no de la pared del canaliculo biliar, comparamos por microscopía de inmunofluorescencia las localizaciones de ATP7B y del marcador de la membrana canalicular MRP2. Los resultados mostraron como el ATP7B reconocido por el anticuerpo Ab2 4P, se extendía a lo largo de los canaliculos biliares flanqueando las membranas canaliculares teñidas con el anticuerpo anti-MRP2 (figura 38, panel C), tal como se había

observado en los estudios realizados con la proteína de las *tight junctions* ZO-1 (Schmitt, Kubitz et al. 2001), y no colocalizaba con el MRP2 (panel B) descartando así, la tinción de los canalículos biliares por el anticuerpo Ab2 4P.



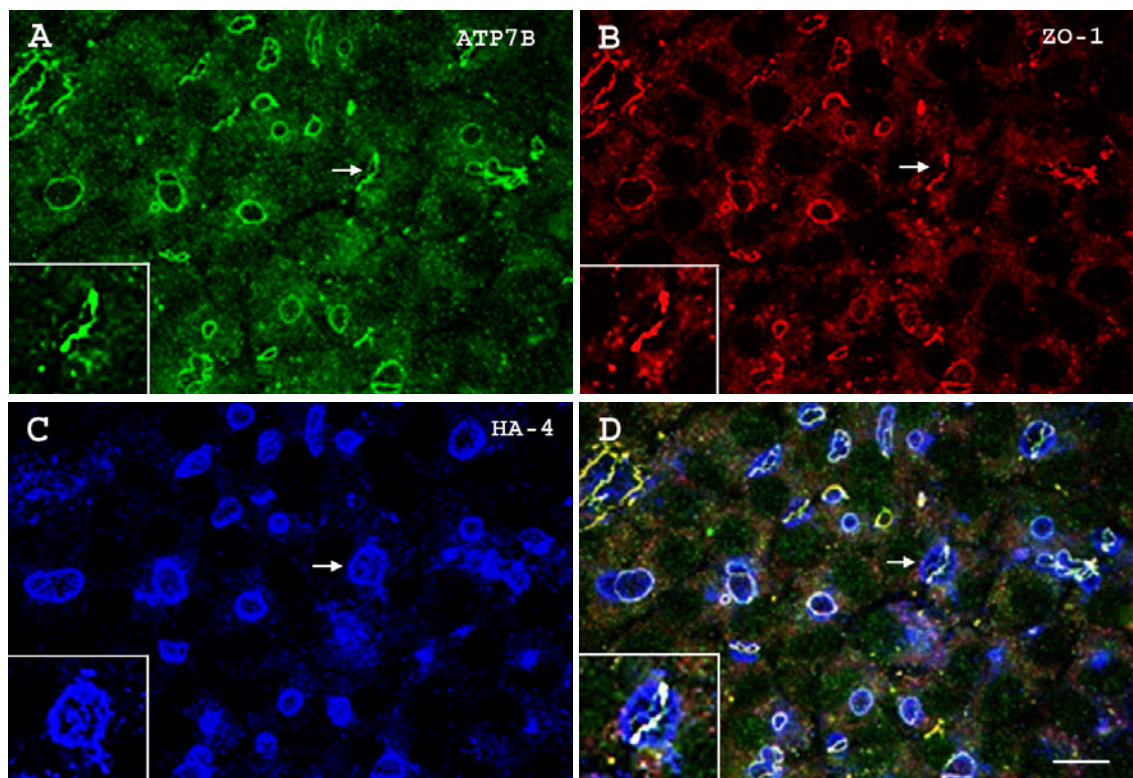
**Figura 38 | El ATP7B teñido con el anticuerpo Ab2 4P, flanquea la membrana canalicular con el MRP2 insertado en ella, en secciones de hígado de rata.** En los paneles A y C (FITC; superposición de canales) se muestra ATP7B en las *tight junctions* flanqueando la membrana canalicular teñida con el anticuerpo anti-MRP2 (panel B, Texas red). En el panel C (superposición de canales) puede observarse como no existe una colocalización entre ambas proteínas, descartando pues, la posibilidad de que el anticuerpo Ab2 4P esté teñiendo la membrana canalicular. En los paneles E y F puede observarse la TGN dispuesta a lo largo de los canalículos biliares delimitados por las *tight junctions* que alojan al ATP7B reconocido por el anticuerpo Ab2 4P. Barras 20μm.

#### 4.4 ATP7B, se localiza en las *tight junctions* de células WIF-B9 polarizadas.

Nuestro siguiente paso fue verificar la autenticidad de esta asociación dentro de líneas celulares de hepatoma ya estudiadas. Para ello, estudiamos la localización de ATP7B con el anticuerpo Ab 4P en células WIF-B9, empleadas por otros grupos para realizar los estudios de la localización de ATP7B (Ihrke, Neufeld et al. 1993).

Para realizar estos experimentos sembramos las células WIF-B9 a una densidad de  $2 \times 10^4$ , y transcurridos 14 días y alcanzada su máxima polaridad, las fijamos y realizamos los ensayos de inmunodetección con los distintos anticuerpos (Cassio, Hamon-Benais et al. 1991).

La figura 39, muestra el resultado de la tinción con los anticuerpos Ab2 4P y anti-ZO-1. Las imágenes que se presentan fueron obtenidas sumando planos ópticos fotografiados a intervalos de 4 micras de grosor en el eje z (Véanse Materiales y Métodos). Como puede observarse en la superposición de los canales (Figura 39 panel D) y en los recuadros a mayor magnificación, la colocalización del ATP7B teñido con el anticuerpo Ab2 4P (Figura 39 panel B) y el marcador de las *tight junctions* ZO-1 (Figura 39 panel A) era perfecta; lo que corroboraba los resultados obtenidos en hígado de rata.

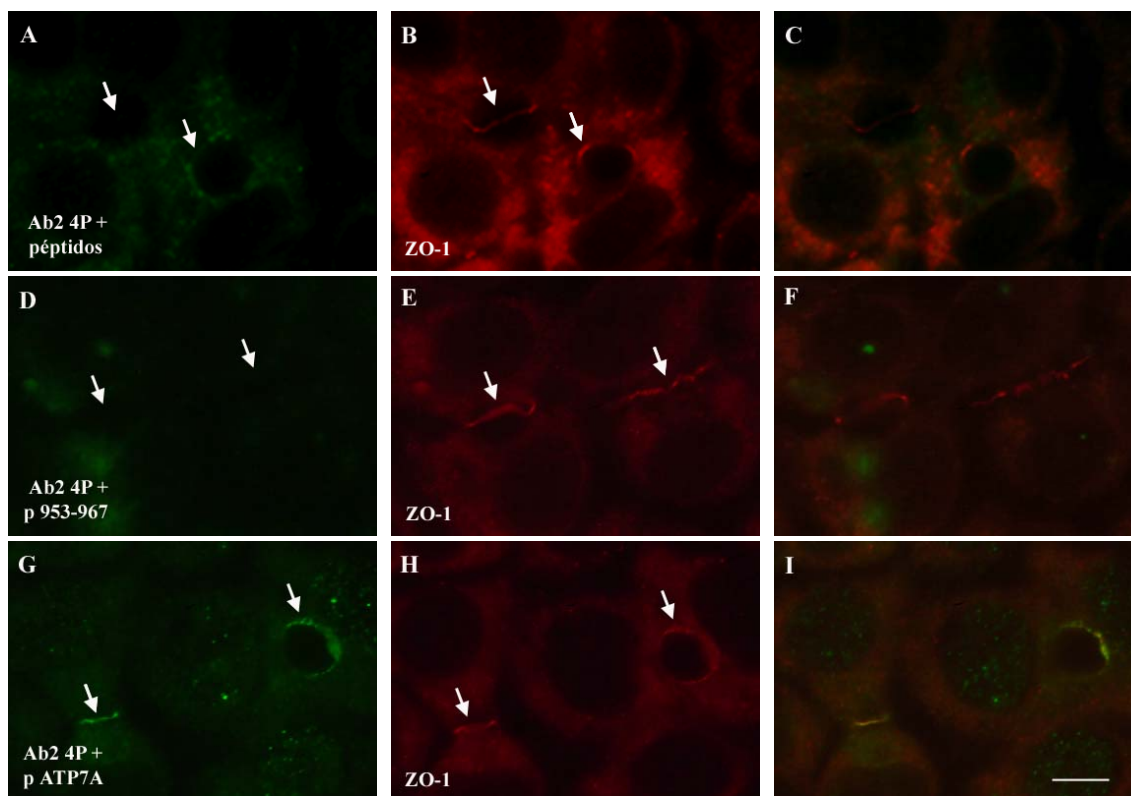


**Figura 39 | (A-D) Colocalización de ATP7B con la proteína presente en las *tight junctions* ZO-1, en células WIF-B9.** Células WIF-B9 crecidas durante 14 días para permitir su diferenciación y la formación de canalículos biliares. Se realizó un triple inmunomarcaje con el anticuerpo anti -ZO-1, para marcar las *tight junctions* (canal FITC), el anticuerpo Ab2 4P anti-ATP7B (canal Texas Red) y el anticuerpo anti -HA4 (canal Cy3) para marcar los canalículos biliares. En los insertos se muestra el detalle de un canalículo biliar, con el objeto de demostrar la perfecta codistribución de ATP7B con la proteína de las *tight junctions*, ZO-1. Barra 20µm.

A continuación, al igual que habíamos realizado previamente con las secciones de hígado de rata, preabsorbimos el anticuerpo Ab2 4P con los péptidos sintetizados para su producción y repetimos el experimento. La figura 40 muestra como la preabsorción del



anticuerpo con la mezcla de los cuatro péptidos sintetizados (Figura 40 paneles A-C) y con el péptido más inmunogénico, el p953-967 (Figura 40 paneles D-E), inhibió la tinción de las *tight junctions*. Por el contrario, el péptido perteneciente a ATP7A no bloqueó su tinción (Figura 40 paneles G-I).

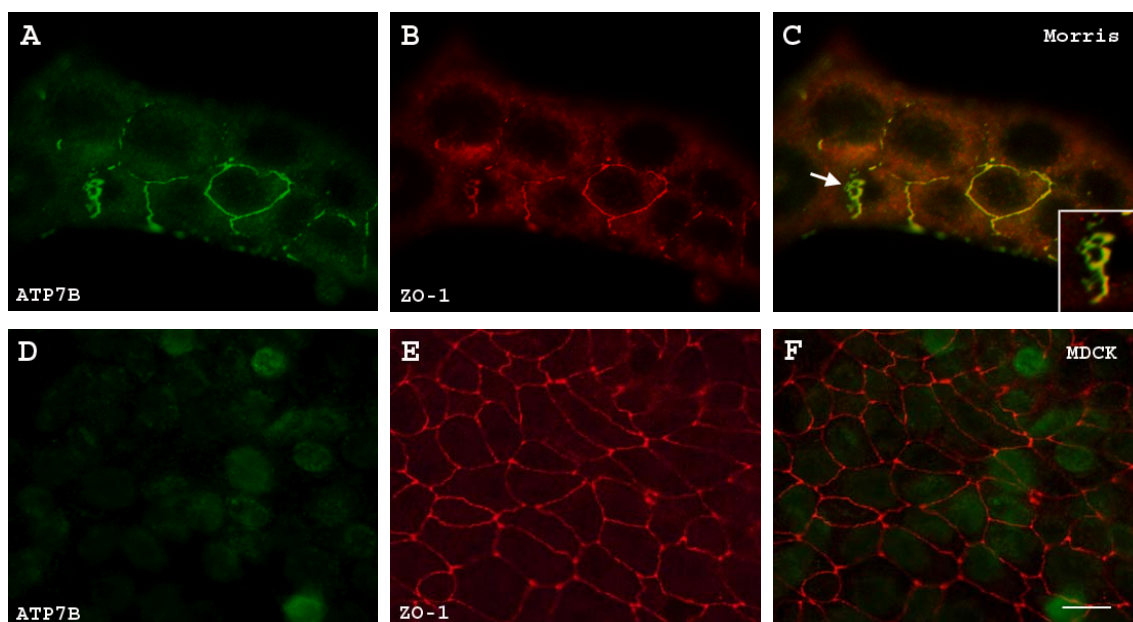


**Figura 40 | La preabsorción del anticuerpo Ab2 4P con los péptidos sintetizados para su producción, inhibe su reacción con el ATP7B presente en las *tight junctions* en las células WIF-B9.** Células WIF-B9 crecidas durante 14 días se tiñeron con los anticuerpos anti-ZO-1 (canal verde, paneles A,D,G y J) y Ab2 4P preabsorbido con 20µm de la mezcla de los 4 péptidos contra los que se produjo (panel B ,canal Texas Red), con 20 µg del péptido p953-967 (panel E), y con un péptido perteneciente a ATP7A (panel K). Como puede observarse en los paneles B y E, la preabsorción del anticuerpo con los péptidos inhibe su reacción con el ATP7B presente en las *tight junctions* confirmando así la especificidad de la reacción.

#### 4.5 El anticuerpo Ab2 4P ATP7B no reacciona con las *tight junctions* de células que no expresan ATP7B.

Los resultados obtenidos con las células WIF-B9, demostraban claramente que el ATP7B codistribuía con el ZO-1 presente en las *tight junctions*. Para confirmar si este resultado

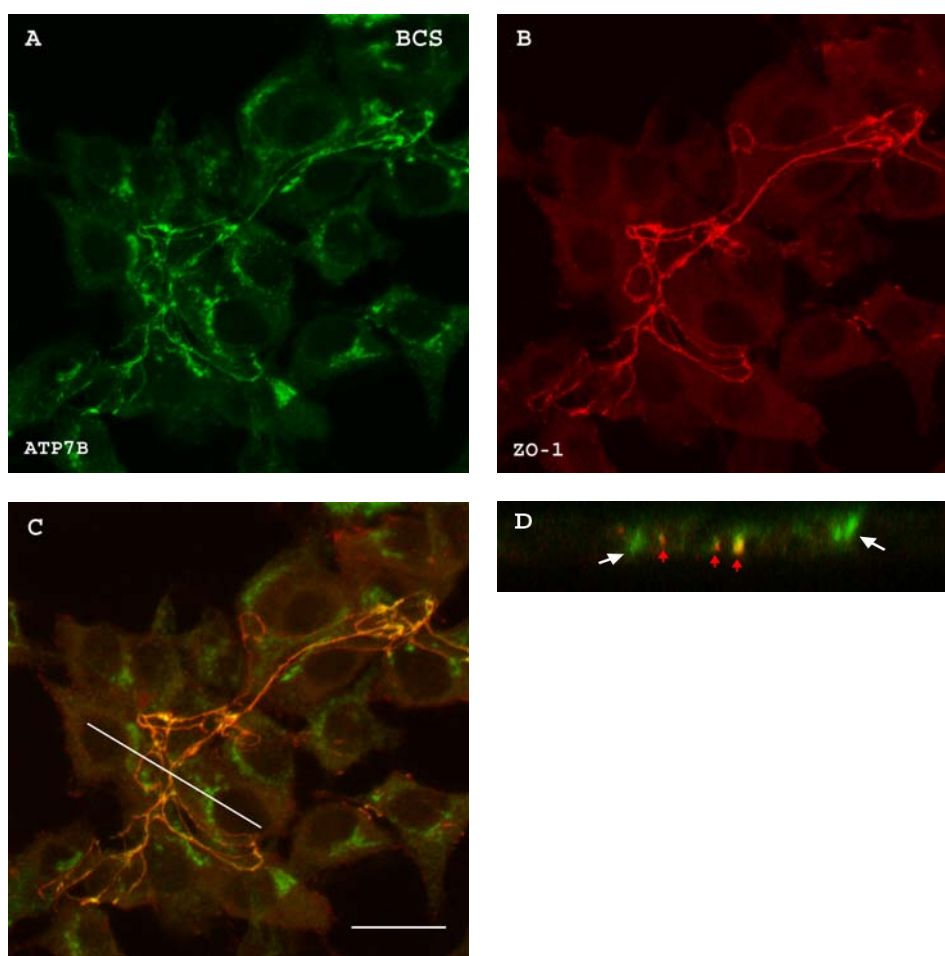
se repetía en otras líneas celulares de origen hepático, empleamos células Morris de hepatoma de rata y las teñimos con los anticuerpos Ab2 4P y anti-ZO-1. Como puede observarse en la figura 41, existe nuevamente una clara codistribución de las dos proteínas (Figura 41, panel C). Para descartar entonces, que el anticuerpo estuviera reaccionando con otra proteína distinta a ATP7B localizada en las *tight junctions*, teñimos esta vez células MDCK que no expresan ATP7B endógenamente, con los anticuerpos Ab2 4P y anti-ZO-1. En el panel F de la figura 41 puede observarse como el anticuerpo anti-ATP7B, a diferencia del anticuerpo anti-ZO-1, no tiñe las *tight junctions* de células MDCK, descartando así que Ab2 4P esté reaccionando con una proteína presente en las *tight junctions* distinta de ATP7B.



**Figura 41 | Colocalización de ATP7B y ZO-1 en las *tight junctions* de células Morris de hepatoma de rata y ausencia de reacción del anticuerpo en células MDCK que no expresan ATP7B endógenamente.** (A-C) Células Morris crecidas en medio completo durante 7 días y que no forman canalículos biliares, teñidas con los anticuerpos anti-ATP7B Ab2 4P (panel A, Texas Red) y anti-ZO-1 (panel B, FITC). El panel C muestra la codistribución de las dos proteínas en las *tight junctions* (D-F) Células MDCK crecidas sobre filtros, teñidas con los mismos anticuerpos. En el panel F puede observarse como el anticuerpo Ab2 4P no reacciona con ninguna proteína presente en las *tight junctions*, confirmando así la especificidad de su reacción.

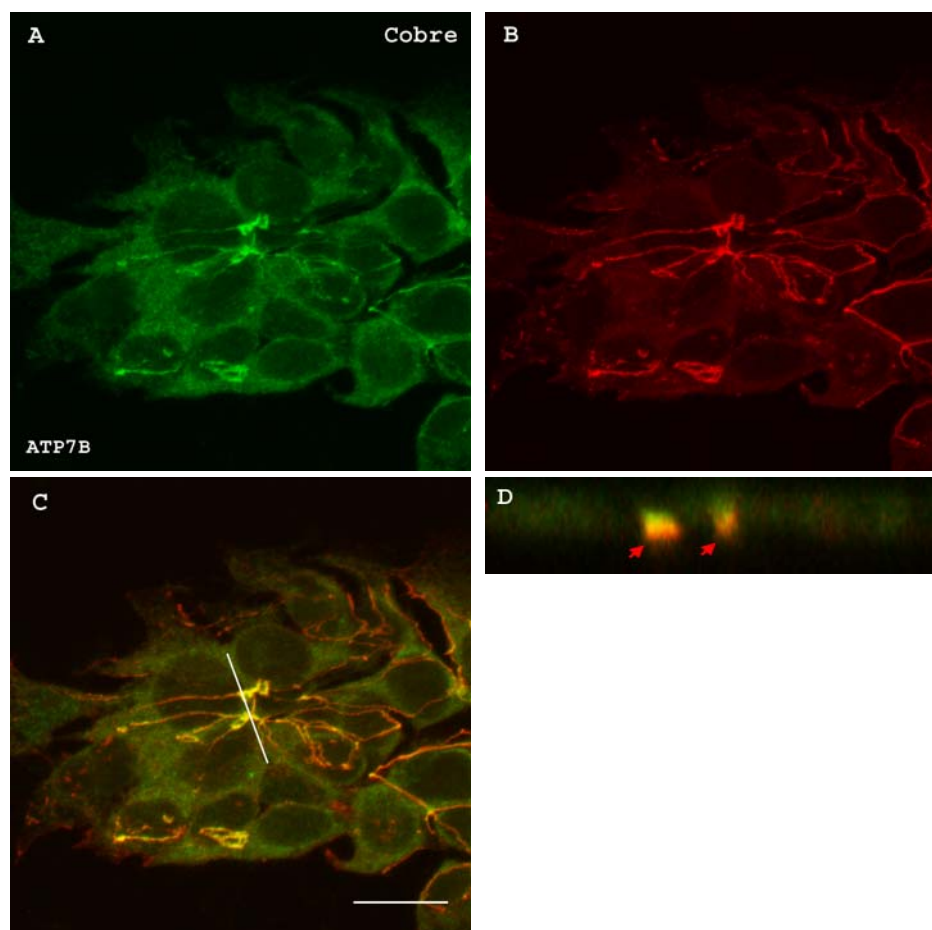
#### 4.6 La población de ATP7B asociada con las *tight junctions* es estable y no sufre cambios en respuesta a variaciones en las concentraciones de cobre celular.

Los estudios realizados con células WIF-B9 fueron repetidos en células Can10 en las que el tráfico de ATP7B entre el Golgi y los canalículos biliares era más fácil de estudiar por el mayor desarrollo de éstas. El objetivo de este estudio fue examinar si la asociación de ATP/B con las *tight junctions* era estable o estaba sometida a los mismos cambios que la población de ATP7B asociada con los canalículos biliares.



**Figura 42** | Las moléculas de ATP7B reconocidas por el anticuerpo Ab2 4P, se localizan en el aparato de Golgi y en las TJs de células Can10 tratadas con 200 μM BCS. Células Can10 crecidas durante 7 días en medio F12K, teñidas con los anticuerpos contra ATP7B (canal FITC) y ZO-1 presente en las TJs (canal Texas Red). El estudio general (paneles A y B) y en particular de planos Z (panel D), permite observar claramente la retención de ATP7B en el Golgi (panel D, flechas blancas) y en las TJs codistribuyendo con ZO-1 (panel D, flechas rojas) **TJs:** *tight junctions*. Barra 20 μM.

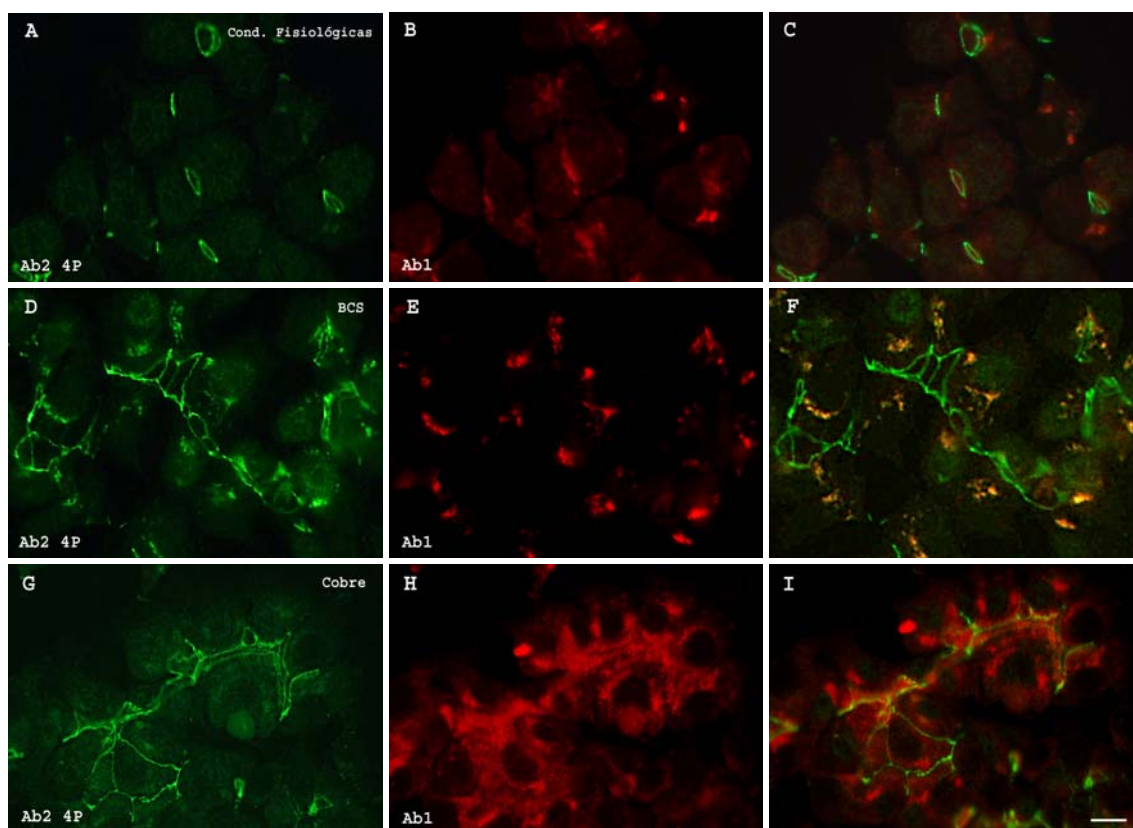
Para ello, incubamos células Can10 con 200 $\mu$ M BCS o 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> y una vez fijadas, las teñimos con los anticuerpos Ab2 4P y anti-ZO-1 para marcar las *tight junctions*. Como puede observarse en la figura 42, tras el tratamiento con BCS, el anticuerpo Ab2 4P reconoció tanto al ATP7B retenido en el aparato de Golgi como al presente en las *tight junctions* (Figura 42 paneles A y D: corte ortogonal, flechas blancas), visible por su colocalización con ZO-1 (Figura 42 paneles C y D: corte ortogonal, flechas rojas). Por otro lado, el aumento del cobre intracelular resultante de la incubación de células Can10 con 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> (Figura 43) actuó liberando al ATP7B secuestrado en el Golgi sin afectar visiblemente al ATP7B asociado con las *tight junctions*.



**Figura 43** | Tras el tratamiento con CuCl<sub>2</sub>, el ATP7B es liberado del aparato de Golgi pero permanece en las TJs de células Can10 polarizadas. Las células Can10 crecidas 7 días en medio F12K, fueron teñidas con el anticuerpo Ab2 4P contra ATP7B (canal FITC) y en anticuerpo anti-ZO-1 (canal Texas Red). Obsérvese en los paneles A-C, y en particular en el estudio de planos en el eje Z ortogonal, (panel D, flechas rojas) como el aumento de la concentración de cobre intracelular, no afecta a la localización de ATP7B en las TJs. Barra: 20 $\mu$ M.



Finalmente, para confirmar la existencia de dos poblaciones de ATP7B en las células hepáticas, teñimos células Can10 con los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P, simultáneamente.



**Figura 44 | Los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P detectan dos poblaciones distintas de ATP7B en células Can10.** Células Can10 crecidas durante 7 días en medio F12K para fomentar la formación de canalículos biliares, fueron incubadas 4 horas con 200µM BCS (paneles D-F) o 200µM CuCl<sub>2</sub> (paneles G-H), siendo teñidas doblemente con los anticuerpos Ab2 4P que reacciona con el ATP7B asociado a las TJs (canal fluoresceína) y Ab1 (canal Texas Red). Obsérvese como la tinción del ATP7B asociado a las TJs (panel G, canal fluoresceína) no varió en las células incubadas con cobre (paneles G-I) con respecto a las tratadas con BCS (paneles D-F), mientras que el ATP7B reconocido por el anticuerpo Ab1 es translocado a la membrana del canalículo biliar (panel H, canal Texas Red). Obsérvese también como en ausencia de cobre (paneles D-F) sí se produjo un aumento en el secuestro del ATP7B en la TGN detectado por ambos anticuerpos (panel F, superposición). Barra 20µm.

Como se muestra en la figura 44, en condiciones fisiológicas el anticuerpo Ab2 4P reaccionó con el ATP7B presente en las *tight junctions* (Figura 44, panel A) mientras que el Ab1, lo hizo con el presente en la TGN y menos en el ARE (Figura 44, panel B). En células tratadas con BCS, ambos anticuerpos reaccionaron con el ATP7B secuestrado en la TGN y sólo

el anticuerpo Ab2 4P reaccionó con las *tight junctions*. Sin embargo, tras el tratamiento con  $\text{CuCl}_2$  el anticuerpo Ab1 reaccionó con el ATP7B translocado a la membrana canalicular (panel H), y el Ab2 4P continuó haciéndolo con las *tight junctions*. Estos resultados indican por tanto, que existen al menos dos poblaciones de ATP7B, una sensible a los cambios en los niveles de cobre celular que es translocada desde la TGN a la membrana del canalículo biliar en respuesta a un aumento en la concentración de cobre y recorre el camino inverso cuando los niveles del metal disminuyen, y una segunda establemente asociada con las *tight junctions*, que no experimenta cambios significativos en su localización, en respuesta a las variaciones en los niveles de cobre celular.



## DISCUSIÓN

---





**Antecedentes y Objetivo.**

El cuerpo central de esta tesis lo construyen los estudios sobre la distribución y tráfico de ATP7B, el transportador hepático de cobre implicado en la eliminación de este metal por la bilis. Ya he descrito en la introducción que el cobre es un metal pesado, esencial para la supervivencia de la célula, pero cuya acumulación puede ser altamente tóxica y causar daños celulares irreversibles. Por este motivo, es imprescindible la existencia de un control riguroso de la homeostasis del cobre en el interior de la célula y los dos principales protagonistas de mantener este equilibrio son los dos transportadores de cobre: ATP7A y ATP7B. Ambas proteínas, pertenecen a la familia de las ATPasas de tipo P (ATPasas- P<sub>1B</sub>) (Bull, Thomas et al. 1993; Tanzi, Petrukhin et al. 1993) y tienen localizaciones tisulares complementarias. Así, mientras que ATP7A se expresa en todos los tejidos aunque está presente a muy bajos niveles en el hígado, ATP7B se expresa principalmente el hígado, riñón, cerebro y placenta (Yamaguchi y col. 1993).

Con anterioridad a este trabajo se había descrito, que bajas concentraciones de cobre celular promueven la retención de ambos transportadores en la red *trans* del aparato de Golgi, TGN, (Suzuki and Gitlin 1999); (Huster, Hoppert et al. 2003) donde ejercen una función biosintética, facilitando la incorporación de cobre a las cuproproteínas que se han sintetizado y se transportan por la ruta secretora. Por el contrario cuando los niveles del metal aumentan, los dos transportadores son liberados y transportados fuera del Golgi para realizar su función homeostática. En cuanto al destino final de ambos transportadores, existen distintos tipos de evidencias experimentales que afectan de manera distinta a ATP7A y ATP7B. Mientras ATP7A es translocado, sin duda alguna, a la membrana plasmática (Petrus, Mercer et al. 1996) y en células epiteliales a su dominio basolateral (Greenough, Pase et al. 2004), los últimos modelos que describen el tráfico de ATP7B en el hepatocito contemplan tanto: a) su translocación a un compartimento vesicular cercano al canalículo biliar sin llegar a la membrana canalicular (Hung, Suzuki et al. 1997, Schaefer y col. 1999, Cater y col. 2006), como b) su distribución a endosomas tardíos donde bombea el cobre que posteriormente se transportará a los lisosomas que lo excretarán a la bilis por exocitosis (Harada y col. 2000), y c) su translocación a la membrana apical atravesando un compartimento vesicular localizado por debajo del canalículo biliar y por el que está continuamente reciclando, hasta que los niveles de cobre vuelven a la normalidad y el transportador regresa al compartimento de retención en la TGN (Roelofsen y col., 2000). Debido a tales discrepancias una parte de los resultados de esta tesis trata el estudio de la translocación de ATP7B fuera de la TGN empleando una nueva línea celular de hepatoma

de rata, las células Can10, con capacidad de polarizar y formar canalículos biliares más largos y ramificados que los observados en células WIF-B y HepG2, empleadas normalmente en este tipo de estudios.

***Caracterización del compartimento que retiene a ATP7B en la TGN a bajos niveles de cobre celular.***

Estudios previos habían descrito que ATP7A y ATP7B son recuperados en las fracciones más densas de gradientes de sacarosa correspondientes a la red *trans* del Golgi y a endosomas tardíos respectivamente, realizados con lisados de células HeLa y HepG2. Igualmente, los estudios de microscopía de inmunofluorescencia en estas mismas células, mostraban que ambos transportadores colocalizan con proteínas como la  $\gamma$ -adaptina AP-1 y el receptor de manosa-6-fosfato, residentes en la red *trans* del Golgi (Suzuki y Gitlin, 1999). Por ello, nuestro primer paso en la caracterización del compartimento donde ATP7B es retenido, ha sido comprobar mediante microscopía de inmunofluorescencia en células Can10 polarizadas, si ATP7B codistribuía con marcadores de la TGN.

Para ello, se desarrolló en el laboratorio un anticuerpo contra los primeros 612 aminoácidos del extremo amino de ATP7B al que denominamos Ab1, con características similares al empleado por otros grupos (Forbes and Cox 2000) y estudiamos por microscopía de inmunofluorescencia la codistribución de ATP7B con los marcadores de los tres compartimentos que constituyen el Golgi, así como con el marcador post-TGN, syn6. El resultado de estos estudios ha determinado que ATP7B colocaliza parcialmente con TGN38 y totalmente con syntaxina 6. Estos resultados, además fueron confirmados estudiando el comportamiento de las estructuras que retienen a ATP7B, frente a la BFA y el macrólico Ro-090179, dos drogas que afectan de manera distinta a las redes *cis* y *trans* y a las cisternas medias del Golgi. Hemos observado como ATP7B y syntaxina 6 exhiben el mismo comportamiento tras el tratamiento de células Can10 con BFA siendo ambas proteínas translocadas al ARE, y como también ATP7B y syntaxina 6 se localizan en los mismos fragmentos del Golgi, resultantes del tratamiento de las mismas células con Ro. Por tanto estos resultados confirman las observaciones previas que ATP7B se localiza en la red *trans* del Golgi.

Por otra parte, para comprobar si ATP7A y ATP7B son retenidas en el mismo compartimento, transfectamos células NRK (que expresan ATP7A pero no ATP7B de manera endógena) con el cDNA del transportador ATP7B llevando el epítipo HA insertado en el tercer buce exofacial de la proteína. Los estudios por microscopía de inmunofluorescencia de estas células han demostrado que ambos transportadores se encuentran en compartimentos

segregados. Además, el estudio de estas mismas células con el anticuerpo anti-ATP7A y los anticuerpos contra marcadores de los 3 compartimentos del Golgi, así como el comportamiento de las estructuras que retienen a ATP7A frente a la BFA y Ro-090179, han demostrado que ATP7A se comporta de la misma manera que la proteína gp74, marcador de la red *cis* del Golgi.

Nuestros resultados indican por lo tanto que ATP7A y ATP7B son retenidos en distintos compartimentos dentro del aparato de Golgi, lo que podría ser relevante de cara a la distribución de proteínas a los distintos dominios de las células polarizadas. Así, debido a que ATP7A es retenido en la red *cis* del Golgi y su destino es basolateral en células epiteliales, y ATP7B es retenido en la TGN y su destino apical en el hepatocito, podríamos avanzar la hipótesis de que proteínas homeostáticas con destinos opuestos (la membrana basolateral o la membrana apical), son retenidas en distintos compartimentos dentro del aparato de Golgi, lo que podría ser objeto de un interesante estudio futuro.

En relación con lo anterior, en nuestro laboratorio se había determinado que otra proteína estudiada con una importante función homeostática, el transportador de Glucosa GLUT4, es translocada desde un compartimento pericentriolar en la TGN, llamado GSC (GLUT4 Storage Compartment) (Martínez-Arca y col., 2000; Holman y Sandoval, 2001) hasta la membrana plasmática en respuesta a la acción de insulina. Se había demostrado que el GLUT4 expresado ectópicamente en cualquier tipo celular, se retenía intracelularmente en este compartimento (Corvera y col. 1994; Dobson y col. 1996), sugiriendo que podría tratarse de un compartimento universal implicado en la retención de proteínas homeostáticas que modificaran de manera transitoria la membrana plasmática, cuando fueran requeridas en ésta para realizar su función.

A este respecto estudiamos si ATP7B era retenido en el mismo compartimento que GLUT4. Tanto los estudios de internalización del ATP7B-HA en un clon de fibroblastos 3T3L1 que expresaban de forma estable GLUT4 (Martínez-Arca, Lalioti et al. 2000) como la cotransfección en células COS-7 con los cDNAs de ambos transportadores, demuestran que ATP7B y GLUT4 son retenidos en el mismo compartimento, y que además, responden y son translocados fuera del compartimento de retención en la TGN, al recibir un estímulo adecuado. Ya que al incubar las células COS-7 transfectadas con 200µM CuCl<sub>2</sub>, se observa como ATP7B es translocado fuera del compartimento mientras que GLUT4 permanece en él, sugiriendo la existencia de mecanismos propios de retención y transporte en vesículas, para cada uno de los transportadores.

***Estudio de la translocación de ATP7B al canalículo biliar en situación de concentraciones altas de cobre celular.***

Ya he comentado al principio de la discusión, que el destino final donde ATP7B ejerce su función homeostática bombeando el exceso de cobre fuera de la célula, resulta un tema controvertido debido a los distintos resultados que se han obtenido en las distintas investigaciones realizadas por otros grupos. Los resultados que hemos obtenido del estudio de la translocación de ATP7B en respuesta al aumento de la concentración de cobre celular en el modelo de células Can10, han determinado la existencia de una translocación masiva de ATP7B a los canalículos biliares teñidos con los anticuerpos anti-MRP2 o anti-HA4 como marcadores de la membrana canalicular. Además, el estudio en concreto de cortes ortogonales realizados en los canalículos y teñidos con un anticuerpo anti-ZO1 como marcador de las *tight junctions* (TJs), separadoras de los dominios apicales de la membrana plasmática y el dominio basolateral, revelan claramente la localización apical de ATP7B a altas concentraciones de cobre y como es excluido de ésta después del tratamiento de las células con BCS para bajar los niveles celulares del metal. Nuestros resultados confirman pues, los descritos por el laboratorio de Vonk en células HepG2 y Hubbard en células WIF-B9 (Roelofsen, Wolters et al. 2000; Guo, Nyasae et al. 2005).

El estudio del anticuerpo Ab1 tanto por microscopía de inmunofluorescencia como por Western Blot, ha puesto de manifiesto su capacidad de reaccionar también con el transportador de cobre ubicuo, ATP7A. Este hecho no resulta extraño ya que ambos transportadores muestran un 60% de homología en la secuencia de aminoácidos de sus dominios N-terminales. Las células Can10 empleadas en nuestros estudios, no expresan ATP7A por tratarse de una línea celular derivada de células Fao de hepatoma de rata. Sin embargo, para el estudio de los mutantes de ATP7B en células Cos-7 que expresan ATP7A, ha sido necesario el desarrollo de otro anticuerpo producido contra 4 péptidos correspondientes a regiones específicas de la secuencia de aminoácidos de ATP7B y que no tuvieran homología con secuencias contenidas en ATP7A ni con otras proteínas descritas en las bases de datos, al que hemos llamado anticuerpo Ab2 4P.

***Estudio de las señales de tráfico y retención en la TGN de ATP7B.***

Una vez verificado que ATP7B es retenido en la TGN con bajos niveles de cobre intracelular y translocado a la membrana del canalículo biliar como consecuencia

del aumento intracelular del metal, hemos identificado dentro de la secuencia de aminoácidos de ATP7B, motivos potenciales que actúen como señales de tráfico y retención de la proteína, empleando como referencia estudios previos realizados en el laboratorio con el transportador de glucosa GLUT4 que como he descrito anteriormente, es retenido en el mismo compartimento que ATP7B. Así, se han descrito para GLUT4 dos señales implicadas en su tráfico intracelular, una de ellas presente en su extremo amino (F<sup>5</sup>QQI) que opera en el transporte del GLUT4 endocitado desde los endosomas al compartimento yuxtannuclear GSC (GLUT4 Storage Compartment) (Palacios, Lalioti et al. 2001), y otra en el extremo carboxilo (RRXXL<sup>489</sup>L) implicada en el transporte desde la red *trans* del Golgi al GSC (Sandoval, Martinez-Arca et al. 2000), además de otras dos señales importantes para su retención intracelular que son el cluster ácido compuesto por los cinco últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína, y cuya delección se ha visto que provoca la falta de retención del GLUT4 en el GSC. También se sabe que la Tyr<sup>502</sup> opera junto con la señal anterior, en la retención de las moléculas de GLUT4 en el compartimento (Martinez-Arca, Lalioti et al. 2000).

En la secuencia de aminoácidos del transportador de cobre ATP7B, hemos detectado tres motivos semejantes a los estudiadas para GLUT4 que son: la F<sup>493</sup>LQI en su dominio aminocitoplásmico y la D<sup>1447</sup>KHSLLL y el cluster ácido D<sup>1457</sup>EEQCI en el extremo carboxilo. Para conocer la implicación de estos motivos en el tráfico y retención del ATP7B en la TGN, realizamos una serie de mutantes y transfectamos células COS-7 o el clon de fibroblastos 3T3-L1 que expresan de forma estable a GLUT4 o el mutante GLUT4Δ8, para comprobar si mutaciones semejantes en ambas proteínas producían el mismo patrón de expresión. La mutación de la F<sup>493</sup>S del motivo F<sup>493</sup>LQI, a diferencia de lo que ocurría con GLUT4, no produjo ningún efecto al comparar mediante microscopía de fluorescencia la internalización del mutante con el ATP7B silvestre, ya que ambas proteínas alcanzaban el compartimento de retención en la TGN, desde la superficie celular. Sin embargo, la delección del cluster ácido D<sup>1460</sup>EEQCI en ATP7B, si produjo el mismo resultado que la delección del cluster ácido en GLUT4, ya que tanto en células 3T3-L1 que expresan GLUT4 como en células COS-7 transfectadas, el mutante no permanece retenido en la TGN y se acumula en vesículas que no son las mismas que las de GLUT4Δ5 indicando una vez más, que existen mecanismos de formación y empaquetamiento de vesículas distintos para ambos transportadores. Por otra parte, la mutación de la lisina K<sup>1448</sup> parece estar implicada en la retención de la proteína en la TGN ya que parece codistribuir con GLUT4 en experimentos de cotransfección con los cDNAs del ATP7B mutado y el transportador de glucosa (Figura S1).

Otro estudio que apoya la existencia de señales en el extremo carboxilo de ATP7B comunes con las de GLUT4 que pueden estar implicadas en la retención de ambas proteínas en

la TGN, ha sido la producción de una proteína de fusión donde la secuencia de aminoácidos correspondiente al extremo C-terminal de GLUT4 ha sido substituida por la correspondiente al extremo C-terminal de ATP7B. Así, al cotransfectar la proteína de fusión junto con el cDNA de GLUT4 en células Vero, hemos observado como ambas proteínas son retenidas en el mismo compartimento en la TGN, lo que sugiere que en el extremo carboxilo de los transportadores GLUT4 y ATP7B, residen los motivos implicados en su secuestro en la TGN, y que el compartimento donde estas proteínas son retenidas, podría tratarse de un orgánulo especializado en la retención de proteínas que modifican de manera transitoria la membrana plasmática en respuesta a la llegada de un estímulo determinado, que provocaría su salida del compartimento donde se encuentran secuestrado cuando no se requieren en la superficie celular. En un intento de buscar otras proteínas homeostáticas que fueran retenidas en el mismo compartimento que ATP7B y GLUT4, hemos estudiado la bomba exportadora de sales biliares Bsep, y los resultados previos obtenidos del estudio de la codistribución de ATP7B y Bsep en células HepG2, son indicativos de que se trate de un posible candidato ya que se aloja en las mismas estructuras que ATP7B (no mostrado).

Se sabe que los motivos dileucina (o leucina-isoleucina) presente en algunas proteínas que circulan entre la membrana plasmática y la TGN, son importantes en el reciclamiento (Corvera, Chawla et al. 1994; Verhey and Birnbaum 1994; Sandoval, Martinez-Arca et al. 2000). Por ejemplo, la señal dileucina también presente en ATP7A D<sup>1483</sup>KHSLLV se ha descrito que está implicada en la endocitosis del transportador desde la membrana plasmática a endosomas de reciclamiento (Francis, Jones et al. 1999) así como en su retorno a la TGN (Petrus and Mercer 1999). Con respecto a ATP7B, se ha publicado un estudio semejante (Cater, La Fontaine et al. 2006) donde la mutación simultánea de las leucinas L<sup>1451</sup>A, L<sup>1452</sup>A, L<sup>1453</sup>A por alaninas, secuestra a la proteína mutada en vesículas citosólicas en células CHO-K1 transfectadas, sugiriendo que la señal trileucina está implicada en la retención de ATP7B en la TGN y en su reciclamiento desde las vesículas citoplasmáticas que serían el destino final de la proteína y no la membrana plasmática (como sugieren otros grupos entre los que nos incluimos nosotros). En nuestro estudio, hemos analizado por separado cada uno de los aminoácidos que constituyen dicho motivo, realizando para ello mutaciones en los residuos D<sup>1447</sup>R/A, K<sup>1448</sup>E/A, L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S, L<sup>1453</sup>S, y hemos comprobado que las mutaciones producidas en los residuos L<sup>1451</sup>S, L<sup>1452</sup>S, D<sup>1447</sup>R/A provocan, como sucede con GLUT4, la acumulación de ATP7B en la membrana plasmática, sugiriendo que al igual que en las células Can10 polarizadas, éste es el destino final de ATP7B y no las vesículas citosólicas sugeridas por Cater y col. Sin embargo, cuando transfectamos en células COS-7 el mutante de la L<sup>1453</sup>S éste es retenido en un compartimento vesicular, que pensamos que pueda estar relacionado con el ARE de las células polarizadas y por el que ya hemos visto que circula ATP7B en su translocación al canalículo

biliar siguiendo el modelo propuesto por Vonk (Roelofsen y col. 2000). Creemos que la mutación de esta leucina L<sup>1453</sup>S, secuestra al ATP7B en este compartimento vesicular impidiendo su llegada a la membrana plasmática, y esto explicaría el resultado obtenido por Cater y colaboradores donde la mutación de las 3 leucinas de forma simultánea, provoca la retención de ATP7B en vesículas citoplasmáticas que son identificadas como el destino final de la proteína (Cater y col., 2006). En un próximo estudio pretendemos transfectar células Can10 polarizadas con el mutante L<sup>1453</sup>S al que hemos introducido el epítipo HA (para poder distinguirlo del ATP7B endógeno que se expresa en estas células), para comprobar si esta mutación provoca verdaderamente la retención de la proteína en el ARE, y por lo tanto confirmar que la L<sup>1453</sup> esta implicada en la salida de ATP7B de este compartimento y en su translocación al canalículo biliar.

El modelo propuesto para la distribución de ATP7B sería: A bajas concentraciones de cobre celular, ATP7B se localiza en la TGN y al aumentar las concentraciones del metal es translocado a vesículas, para posteriormente pasar a un compartimento vesicular y finalmente llegar a la membrana plasmática. Del estudio de los mutantes se deduce que siguiendo este esquema, el residuo K<sup>1448</sup> estaría implicado en el paso de las vesículas al compartimento vesicular, el cluster ácido D<sup>1457</sup>EEQCI estaría implicado en la retención de ATP7B en la TGN, la L<sup>1453</sup> estaría implicada en la salida del compartimento vesicular a la membrana plasmática y en el reciclamiento desde éste a la TGN (en situación de bajo cobre) y los residuos D<sup>1447</sup>, L<sup>1451</sup> y L<sup>1452</sup> estarían implicados en el reciclamiento desde la membrana plasmática y las vesículas a la TGN (Esquema en Figura 45).

### ***Estudio de la presencia de ATP7B en las tight junctions***

Para el desarrollo del anticuerpo Ab2-4P, se sintetizaron cuatro péptidos seleccionados de la secuencia de aminoácidos del ATP7B de ratón. Para su caracterización realizamos estudios de inmunofluorescencia en secciones de hígado de rata, embebido en parafina. Estudios semejantes realizados por otros investigadores, tanto en hígado de rata como en hígado humano, habían descrito que el ATP7B se encontraba en vesículas a ambos lados del canalículo biliar, colocalizando con marcadores de la red *trans* del Golgi y que apenas se encontraba tiñendo los canalículos biliares (Schaefer y col. 1999; Schaeffer y col. 1999b). Los estudios de ATP7B por microscopía en células de hepatoma e hígado de rata con el anticuerpo Ab2 4P, han demostrado la existencia de una población de ATP7B localizada en las TJs.



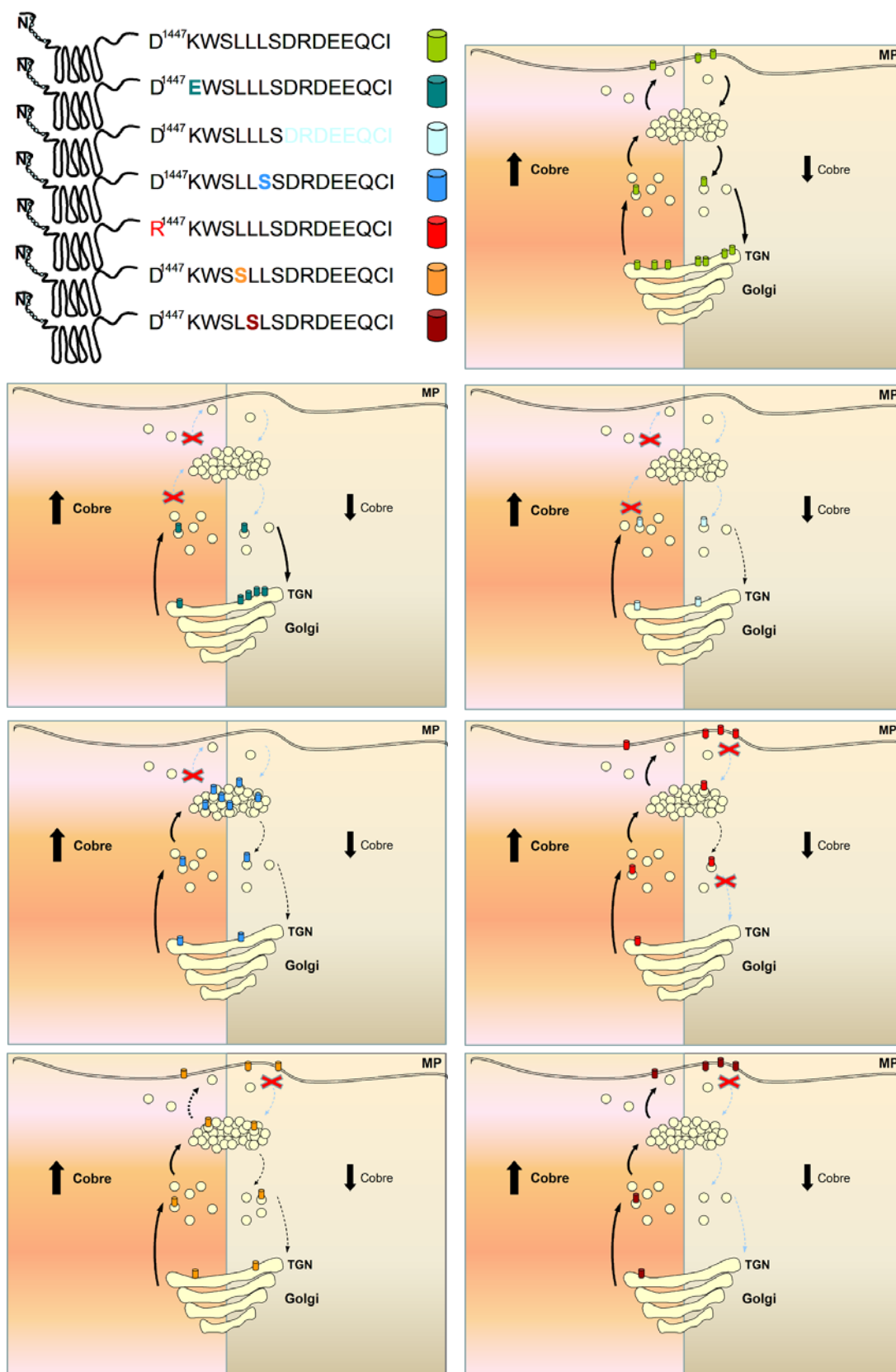


Figura 45 | Representación esquemática del comportamiento de ATP7B y los mutantes estudiados, frente a las variaciones de cobre intracelular.

Los estudios de preabsorción del anticuerpo con los péptidos contra los que se había generado, así como la tinción negativa con el anticuerpo de células MDCK, una línea celular polarizada que forma TJs pero que no expresan al transportador ATP7B, como los estudios realizados por *Western blot* donde el anticuerpo no reacciona con ninguna proteína presente en un extracto de mucosa intestinal de rata que también presenta TJs, y sí en los extractos de hígado donde se expresa, descartan en principio, la posibilidad de que el anticuerpo esté reaccionando con otra proteína presente en las TJs distinta de ATP7B. No obstante, para estar completamente seguros de ese resultado, no descartamos el realizar en un futuro próximo estos mismos estudios con hígados de ratones *atp7b*<sup>-/-</sup>, que no expresan ATP7B.

El estudio del comportamiento del ATP7B presente en las TJs, frente a las variaciones de la concentración de cobre intracelular, mediante el estudio por microscopía de fluorescencia realizado en el modelo de células Can10 teñidas con los anticuerpos Ab2-4P y anti-ZO-1 como marcador de las TJs, indica que ATP7B permanece aparentemente inmóvil en ellas independientemente del aumento o no de las concentraciones de cobre intracelular. Este resultado sugiere la existencia de dos poblaciones distintas: una sensible a la variación de la concentración de cobre intracelular y otra inmóvil en las TJs. Sería interesante el determinar la existencia de posibles modificaciones de las moléculas de ATP7B presentes en el canalículo biliar y en las TJs, así como mecanismos de segregación entre las dos localizaciones. En relación a este punto, cabe destacar la existencia de algunas diferencias en cuanto a la detección de las dos poblaciones de ATP7B con los anticuerpos Ab1 y Ab2 4P. Así, ambos anticuerpos reconocen al ATP7B retenido en la TGN en células Can10 tratadas con BCS, sin embargo el anticuerpo Ab2 4P no reconoce al ATP7B translocado al canalículo biliar en células tratadas con cobre y el anticuerpo Ab1 no reacciona con el ATP7B localizado en las TJs, sugiriendo la posibilidad de la existencia de enmascaramientos de los epítomos, que impiden que el anticuerpo reaccione.

Una posible explicación a la imposibilidad del anticuerpo Ab2 4P de detectar el ATP7B translocado a la superficie del canalículo biliar, puede obtenerse de la observación detenida de la secuencia de los péptidos sintetizados para la producción del anticuerpo. Así, la secuencia del péptido por el que el anticuerpo exhibe una mayor reactividad en el test del ELISA, QKYF**P**SPSKHISQTE, contiene una serina (S958) que analizada por el programa *Motif Scan* es altamente susceptible de ser fosforilada por la quinasa cdk5. Esta observación junto al estudio publicado por Vanderwerf y colaboradores, donde se sugiere que la translocación de ATP7B hacia la membrana apical mediada por el cobre, implica la fosforilación en serinas de la proteína (Vanderwerf, Cooper et al. 2001; Vanderwerf and Lutsenko 2002), podría sugerir que el ATP7B presente en la membrana del canalículo biliar pudiera estar fosforilado en la serina 958, lo que

produciría la modificación del epítopo y como consecuencia, la falta de reconocimiento por el anticuerpo.

Por otra parte, el hecho de que el anticuerpo Ab1 no reconozca el “pool” presente en las TJs puede indicar que, o bien en las TJs el extremo N-terminal de ATP7B reconocido por el anticuerpo permanece inaccesible, o bien que el ATP7B presente en las TJs carezca de él. Esta forma “corta” del transportador de cobre, podría formarse por *splicing* alternativo del gen ATP7B. A este respecto cabe destacar la existencia de la ATPasa pineal PINA que se expresa de manera nocturna en la glándula pineal de adultos y en la retina y que funciona como transportador de cobre a pesar de carecer de los sitios de unión a cobre del extremo amino del ATP7B completo y de los 4 primeros segmentos transmembrana (Borjigin y col. 1999). La ausencia del extremo amino y por lo tanto de los sitios de unión a cobre, podría explicar por qué esta forma corta del ATP7B permanecería estable en la *tight junction*, y no se moviliza en respuesta al aumento de la concentración de cobre celular, ya que estudios realizados por otros grupos, donde mutan las cisteínas presentes en los 6 sitios de unión a cobre de ATP7B por serinas, han demostrado que impiden la translocación de la proteína fuera de la TGN (Cater y col 2004). Además, se ha descrito que algunas proteínas relacionadas con el cobre, contienen secuencias ricas en metioninas e histidinas que pueden funcionar como dominios de unión a él (Dancis y col. 1994). Si examinamos el extremo carboxilo del ATP7B de rata, existen tres sitios HXXM, <sup>1375</sup>HGRM, <sup>1389</sup>HVGM y <sup>1427</sup>HGGM, que no están presentes en el transportador de cobre análogo ATP7A, que pueden actuar uniendo el metal. Otro dato que puede apoyar la hipótesis de la existencia de esta forma “corta” de ATP7B, es la presencia en el *Western blot* de membranas totales de hígado de rata, de una banda de unos 64 kDa fuertemente detectada por el anticuerpo Ab2 y que no se detecta con el anticuerpo Ab1 (Fig. suplementaria S2). Evidentemente, es necesario realizar más investigaciones para confirmar esta hipótesis.

Una vez determinada la presencia de ATP7B en las TJs la pregunta que surge es ¿cuál es la función de la proteína en esta localización? Se sabe que en el hígado, los iones se transportan desde la sangre a la bilis mediante un transporte transcelular o paracelular a través de las TJs. Por ello, en el laboratorio se ha estudiado la posibilidad de que ATP7B estuviera implicada en el transporte paracelular de cobre. Para ello, se analizó la aparición de Cu<sup>64</sup> en la bilis después de su inyección en la vena portal de hígados de rata perfundidos, y se comparó con dos marcadores del transporte paracelular (la HRP y la inulina). Los resultados procedentes de tres experimentos independientes mostraron coincidencias en la excreción de HRP, inulina y Cu<sup>64</sup> en la bilis, sugiriendo la existencia de un transporte paracelular de cobre, que no era inhibido tras el tratamiento de los hígados con 2mmol/L BCS para eliminar el ATP7B presente en el canalículo biliar, lo que si impedía la excreción de Cu<sup>64</sup> mediante el transporte transcelular.

Una hipótesis plausible podría ser por tanto, que el ATP7B presente en la TJs funcionara directamente en la excreción de cobre, como un mecanismo de seguridad para mantener las concentraciones del metal por debajo de niveles tóxicos para la célula, o bien, podría formar parte de un mecanismo dependiente de cobre que regulase la función de la TJs. Un caso semejante es el de la bomba de sodio, Na, K-ATPasa (también miembro de la familia de ATPasas de tipo P) que cataliza el transporte (dependiente de ATP) de 3 iones sodio fuera de la células y de dos iones potasio al interior de ésta, y que ha sido recientemente implicada en la regulación de la formación, estructura y permeabilidad de las TJs. No obstante, todavía se desconocen como este transportador puede llevar a cabo esta regulación (Rajasekaran and Rajasekaran 2003). Se ha sugerido que la actividad enzimática de la Na-K-ATPasa conjuntamente con su función homeostática, pudiera provocar la fosforilación de proteínas presentes en las TJs alterando así su permeabilidad o incluso que las propias subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  o ambas, actuaran regulando la función de la TJ mediante la asociación directa o indirecta con proteínas presentes en éstas. A este respecto, estudios preliminares donde hemos observado la interacción de ATP7B con ZO-1 mediante ensayos de inmunoprecipitación, sugieren que ATP7B podría actuar como un transductor que uniera los cambios en los niveles de cobre celulares con cambios en la estructura y función de las TJs.

Aunque la asociación de la Na, K-ATPasa con las TJs es la más estudiada, se han descrito otras proteínas asociadas a la TJ, como el canal de cloro ClC-2 (en las TJs de células del epitelio intestinal de ratón y de células Caco-2), CLIC4 y TRPC4 cuya interacción con el primer dominio PDZ de ZO-1 se ha sugerido que forma parte del complejo de señalización en las TJs de astrositos, que regula la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mohammad-Panah, Gyomerey et al. 2001; Berryman and Goldenring 2003; Song, Zhao et al. 2005). Otros ejemplos estudiados de transportadores que colocalizan con ZO-1 han sido, el transportador de glucosa GLUT1 en la retina, cuerpo ciliar e iris de ratón (Tserentsoodol, Shin et al. 1998; Tserentsoodol, Shin et al. 1999) y el transportador Mrp3 (miembro de la familia de las proteínas de resistencia a múltiples drogas) en el plexo coroideo, intestino y riñón de ratón y para el que se ha propuesto un papel protector en la acumulación de sales biliares en el hígado (Soontornmalai, Vlaming et al. 2006). No obstante, la prueba definitiva para confirmar la implicación de ATP7B en el transporte paracelular de cobre, sería realizar este mismo estudio en hígados de ratas LEC (Lond Evans Cinnamon) que no expresan ATP7B debido a una delección en 3' del gen *atp7b* o realizar el estudio con hígados de ratones *atp7b*<sup>-/-</sup>.



## CONCLUSIONES

---



1. A bajos niveles de cobre celular, ATP7B es retenido junto con syntaxina en un compartimento indeterminado de la red trans del Golgi.
2. El compartimento que retiene a ATP7B es universal y también contiene al transportador de glucosa sensible a insulina GLUT4, proteínas que al igual que ATP7B cumple una función homeostática en la membrana plasmática.
3. En contra de lo que se piensa hasta el momento, el transportador de cobre ubicuo con destino final la membrana basolateral ATP7A, se retiene en un compartimento en la zona cis del Golgi distinto al de ATP7B.
4. En líneas celulares hepáticas polarizadas, en respuesta al incremento en los niveles de cobre celular, ATP7B es translocado a la membrana del canalículo biliar.
5. Existe una segunda población de ATP7B localizada en las *tight junctions*, cuya distribución es independiente de los cambios en los niveles de cobre y que, según experimentos desarrollados independientemente en el laboratorio, funciona en el transporte paracelular a cobre de la sangre a la bilis.
6. Al igual que GLUT4, el extremo C-terminal de ATP7B juega un papel fundamental en su retención/reciclamiento a la red *trans* del Golgi al igual que la señal tri-leucina.





## BIBLIOGRAFÍA

---



- Alcalde, J., P. Bonay, et al. (1992). "Assembly and disassembly of the Golgi complex: two processes arranged in a cis-trans direction." J Cell Biol **116**(1): 69-83.
- Alvarez de Santos, M. and P. Moreno (1984). "[Mild form of Menkes syndrome]." Rev Invest Clin **36**(2): 151-4.
- Apodaca, G., L. A. Katz, et al. (1994). "Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes." J Cell Biol **125**(1): 67-86.
- Aurand-Lions, M., C. Johnson-Leger, et al. (2001). "Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members." Blood **98**(13): 3699-707.
- Balda, M. S. and K. Matter (2000). "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression." Embo J **19**(9): 2024-33.
- Balda, M. S., J. A. Whitney, et al. (1996). "Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein." J Cell Biol **134**(4): 1031-49.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (2005). "A NMR study of the interaction of a three-domain construct of ATP7A with copper(I) and copper(I)-HAH1: the interplay of domains." J Biol Chem **280**(46): 38259-63.
- Banci, L., I. Bertini, et al. (2005). "An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein." Febs J **272**(3): 865-71.
- Barroso, M. and E. S. Sztul (1994). "Basolateral to apical transcytosis in polarized cells is indirect and involves BFA and trimeric G protein sensitive passage through the apical endosome." J Cell Biol **124**(1-2): 83-100.
- Bartee, M. Y. and S. Lutsenko (2007). "Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level." Biometals **20**(3-4): 627-37.
- Bartee, M. Y. and S. Lutsenko (2007). "Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level." Biometals.
- Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, et al. (2000). "Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin." J Biol Chem **275**(27): 20520-6.

- Bingham, M. J., T. J. Ong, et al. (1996). "ATP-dependent copper transporter, in the Golgi apparatus of rat hepatocytes, transports Cu(II) not Cu(I)." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): G741-6.
- Bock, J. B., J. Klumperman, et al. (1997). "Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking." Mol Biol Cell **8**(7): 1261-71.
- Boehm, M. and J. S. Bonifacino (2001). "Adaptins: the final recount." Mol Biol Cell **12**(10): 2907-20.
- Bomsel, M., K. Prydz, et al. (1989). "Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **109**(6 Pt 2): 3243-58.
- Bonifacino, J. S. and J. Lippincott-Schwartz (2003). "Coat proteins: shaping membrane transport." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 409-14.
- Brown, D. A., B. Crise, et al. (1989). "Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells." Science **245**(4925): 1499-501.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.
- Bull, P. C., G. R. Thomas, et al. (1993). "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene." Nat Genet **5**(4): 327-37.
- Camakaris, J., L. Ackland, et al. (1980). "Abnormal copper metabolism in cultured fibroblasts from patients with Wilson's disease." J Inherit Metab Dis **3**(4): 155-7.
- Camakaris, J., D. M. Danks, et al. (1980). "Altered copper metabolism in cultured cells from human Menkes' syndrome and mottled mouse mutants." Biochem Genet **18**(1-2): 117-31.
- Carafoli, E. (1992). "P-type ATPases. Introduction." J Bioenerg Biomembr **24**(3): 245-7.
- Carr, H. S., G. N. George, et al. (2002). "Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein." J Biol Chem **277**(34): 31237-42.
- Caruano-Yzermans, A. L., T. B. Bartnikas, et al. (2006). "Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase." J Biol Chem **281**(19): 13581-7.

- Casanova, J. E., X. Wang, et al. (1999). "Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **10**(1): 47-61.
- Casareno, R. L., D. Waggoner, et al. (1998). "The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase." J Biol Chem **273**(37): 23625-8.
- Cater, M. A., S. La Fontaine, et al. (2006). "ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion." Gastroenterology **130**(2): 493-506.
- Cereijido, M., E. S. Robbins, et al. (1978). "Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support." J Cell Biol **77**(3): 853-80.
- Cordenonsi, M., F. D'Atri, et al. (1999). "Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin." J Cell Biol **147**(7): 1569-82.
- Cousins, R. J. (1985). "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin." Physiol Rev **65**(2): 238-309.
- Crampton, R. F., D. M. Matthews, et al. (1965). "Observations on the Mechanism of Absorption of Copper by the Small Intestine." J Physiol **178**: 111-26.
- Culotta, V. C. (2000). "Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism." Curr Top Cell Regul **36**: 117-32.
- Culotta, V. C., S. J. Lin, et al. (1999). "Intracellular pathways of copper trafficking in yeast and humans." Adv Exp Med Biol **448**: 247-54.
- Czech, M. P., A. Chawla, et al. (1993). "Exofacial epitope-tagged glucose transporter chimeras reveal COOH-terminal sequences governing cellular localization." J Cell Biol **123**(1): 127-35.
- Chelly, J. and A. P. Monaco (1993). "Cloning the Wilson disease gene." Nat Genet **5**(4): 317-8.
- Chelly, J., Z. Tumer, et al. (1993). "Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein." Nat Genet **3**(1): 14-9.
- Chen, Y., C. Merzdorf, et al. (1997). "COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos." J Cell Biol **138**(4): 891-9.

- Cheong, K. H., D. Zacchetti, et al. (1999). "VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6241-8.
- D'Atri, F. and S. Citi (2001). "Cingulin interacts with F-actin in vitro." FEBS Lett **507**(1): 21-4.
- D'Atri, F., F. Nadalutti, et al. (2002). "Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells." J Biol Chem **277**(31): 27757-64.
- D'Souza, T., R. Agarwal, et al. (2005). "Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells." J Biol Chem **280**(28): 26233-40.
- Danielsen, E. M. and B. van Deurs (1997). "Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters." Mol Biol Cell **8**(11): 2241-51.
- Danks, D. M. (1980). "Copper deficiency in humans." Ciba Found Symp **79**: 209-25.
- Danks, D. M. (1988). "The mild form of Menkes disease: progress report on the original case." Am J Med Genet **30**(3): 859-64.
- Darsow, T., C. G. Burd, et al. (1998). "Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE." J Cell Biol **142**(4): 913-22.
- Delacour, D., C. I. Cramm-Behrens, et al. (2006). "Requirement for galectin-3 in apical protein sorting." Curr Biol **16**(4): 408-14.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, et al. (1999). "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." J Biol Chem **274**(11): 7278-85.
- Dell'Angelica, E. C., R. Puertollano, et al. (2000). "GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex." J Cell Biol **149**(1): 81-94.
- Deora, A. A., D. Gravotta, et al. (2004). "The basolateral targeting signal of CD147 (EMMPRIN) consists of a single leucine and is not recognized by retinal pigment epithelium." Mol Biol Cell **15**(9): 4148-65.
- Dierick, H. A., A. N. Adam, et al. (1997). "Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network." Hum Mol Genet **6**(3): 409-16.

- Doyle, C., M. G. Roth, et al. (1985). "Mutations in the cytoplasmic domain of the influenza virus hemagglutinin affect different stages of intracellular transport." J Cell Biol **100**(3): 704-14.
- Dunbar, L. A., P. Aronson, et al. (2000). "A transmembrane segment determines the steady-state localization of an ion-transporting adenosine triphosphatase." J Cell Biol **148**(4): 769-78.
- Ebnet, K., A. Suzuki, et al. (2001). "The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)." Embo J **20**(14): 3738-48.
- Eskelinen, E. L., C. Meyer, et al. (2002). "The polarized epithelia-specific mu 1B-adaptin complements mu 1A-deficiency in fibroblasts." EMBO Rep **3**(5): 471-7.
- Falconi, M., M. Iovino, et al. (1999). "A model for the incorporation of metal from the copper chaperone CCS into Cu,Zn superoxide dismutase." Structure **7**(8): 903-8.
- Ferruzza, S., Y. Sambuy, et al. (2000). "Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line." Biometals **13**(2): 179-85.
- Figus, A., A. Angius, et al. (1995). "Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations." Am J Hum Genet **57**(6): 1318-24.
- Folsch, H., H. Ohno, et al. (1999). "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." Cell **99**(2): 189-98.
- Forbes, J. R. and D. W. Cox (2000). "Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins." Hum Mol Genet **9**(13): 1927-35.
- Forbes, J. R., G. Hsi, et al. (1999). "Role of the copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease." J Biol Chem **274**(18): 12408-13.
- Francis, M. J., E. E. Jones, et al. (1999). "Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane." J Cell Sci **112** ( Pt 11): 1721-32.
- Freedman, J. H., M. R. Ciriolo, et al. (1989). "The role of glutathione in copper metabolism and toxicity." J Biol Chem **264**(10): 5598-605.
- Freedman, J. H. and J. Peisach (1989). "Intracellular copper transport in cultured hepatoma cells." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 134-40.



- Furuse, M., K. Fujita, et al. (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol **141**(7): 1539-50.
- Furuse, M., K. Furuse, et al. (2001). "Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells." J Cell Biol **153**(2): 263-72.
- Furuse, M., T. Hirase, et al. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-88.
- Furuse, M., H. Sasaki, et al. (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." J Cell Biol **143**(2): 391-401.
- Gan, Y., T. E. McGraw, et al. (2002). "The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane." Nat Cell Biol **4**(8): 605-9.
- Gibson, A., C. E. Futter, et al. (1998). "Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells." J Cell Biol **143**(1): 81-94.
- Glerum, D. M., A. Shtanko, et al. (1996). "Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase." J Biol Chem **271**(24): 14504-9.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, et al. (2000). "MAGUK proteins: structure and role in the tight junction." Semin Cell Dev Biol **11**(4): 315-24.
- Gravotta, D., A. Deora, et al. (2007). "AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1564-9.
- Greenough, M., L. Pase, et al. (2004). "Signals regulating trafficking of Menkes (MNK; ATP7A) copper-translocating P-type ATPase in polarized MDCK cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(5): C1463-71.
- Griffiths, G. and K. Simons (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." Science **234**(4775): 438-43.
- Guo, Y., L. Nyasae, et al. (2005). "NH2-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(5): G904-16.
- Guo, Y., K. Smith, et al. (2004). "Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter." J Biol Chem **279**(17): 17428-33.

- Guo, Y., K. Smith, et al. (2004). "Cisplatin stabilizes a multimeric complex of the human Ctr1 copper transporter: requirement for the extracellular methionine-rich clusters." J Biol Chem **279**(45): 46393-9.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol **186**: 1-85.
- Hamza, I. and J. D. Gitlin (2002). "Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease." J Bioenerg Biomembr **34**(5): 381-8.
- Hamza, I., M. Schaefer, et al. (1999). "Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13363-8.
- Harada, M., S. Sakisaka, et al. (2000). "Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes." Gastroenterology **118**(5): 921-8.
- Harris, Z. L. and J. D. Gitlin (1996). "Genetic and molecular basis for copper toxicity." Am J Clin Nutr **63**(5): 836S-41S.
- Harris, Z. L., L. W. Klomp, et al. (1998). "Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis." Am J Clin Nutr **67**(5 Suppl): 972S-977S.
- Hassett, R. and D. J. Kosman (1995). "Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **270**(1): 128-34.
- Hopkins, C. R., A. Gibson, et al. (1994). "In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella." J Cell Biol **125**(6): 1265-74.
- Horng, Y. C., P. A. Cobine, et al. (2004). "Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase." J Biol Chem **279**(34): 35334-40.
- Hou, J., D. L. Paul, et al. (2005). "Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions." J Cell Sci **118**(Pt 21): 5109-18.
- Hubbard, A. L., J. R. Bartles, et al. (1985). "Identification of rat hepatocyte plasma membrane proteins using monoclonal antibodies." J Cell Biol **100**(4): 1115-25.

- Hung, I. H., M. Suzuki, et al. (1997). "Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **272**(34): 21461-6.
- Hunziker, W. and P. J. Peters (1998). "Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells." J Biol Chem **273**(25): 15734-41.
- Huster, D., M. Hoppert, et al. (2003). "Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines." Gastroenterology **124**(2): 335-45.
- Ihrke, G., G. V. Martin, et al. (1998). "Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes." J Cell Biol **141**(1): 115-33.
- Ihrke, G., E. B. Neufeld, et al. (1993). "WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1761-75.
- Ikenouchi, J., M. Matsuda, et al. (2003). "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail." J Cell Sci **116**(Pt 10): 1959-67.
- Itoh, M., M. Furuse, et al. (1999). "Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins." J Cell Biol **147**(6): 1351-63.
- Itoh, M., H. Sasaki, et al. (2001). "Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions." J Cell Biol **154**(3): 491-7.
- Jiang, J., I. A. Nadas, et al. (2005). "A Mets motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination." Inorg Chem **44**(26): 9787-94.
- Johnson, K. F. and S. Kornfeld (1992). "The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi." J Cell Biol **119**(2): 249-57.
- Kaler, S. G. (1998). "Diagnosis and therapy of Menkes syndrome, a genetic form of copper deficiency." Am J Clin Nutr **67**(5 Suppl): 1029S-1034S.
- Kaler, S. G. and Z. Tumer (1998). "Prenatal diagnosis of Menkes disease." Prenat Diagn **18**(3): 287-9.

- Kipp, H. and I. M. Arias (2000). "Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver." J Biol Chem **275**(21): 15917-25.
- Klomp, L. W., S. J. Lin, et al. (1997). "Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis." J Biol Chem **272**(14): 9221-6.
- Kostrewa, D., M. Brockhaus, et al. (2001). "X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif." Embo J **20**(16): 4391-8.
- Kuivaniemi, H., L. Peltonen, et al. (1982). "Abnormal copper metabolism and deficient lysyl oxidase activity in a heritable connective tissue disorder." J Clin Invest **69**(3): 730-3.
- La Fontaine, S. L., S. D. Firth, et al. (1998). "Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblasts by expression of the Menkes and Wilson ATPases." J Biol Chem **273**(47): 31375-80.
- Larin, D., C. Mekios, et al. (1999). "Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p." J Biol Chem **274**(40): 28497-504.
- Leary, S. C., B. A. Kaufman, et al. (2004). "Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase." Hum Mol Genet **13**(17): 1839-48.
- Lee, J., M. M. Pena, et al. (2002). "Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1." J Biol Chem **277**(6): 4380-7.
- Letourneur, F. and R. D. Klausner (1992). "A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains." Cell **69**(7): 1143-57.
- Leung, S. M., W. G. Ruiz, et al. (2000). "Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **11**(6): 2131-50.
- Li, D. and R. J. Murny (2000). "Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin." J Cell Biol **148**(4): 791-800.
- Linder, M. C. and M. Hafez-Azam (1996). "Copper biochemistry and molecular biology." Am J Clin Nutr **63**(5): 797S-811S.

- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, et al. (1989). "Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER." Cell **56**(5): 801-13.
- Lisanti, M. P., M. Sargiacomo, et al. (1988). "Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9557-61.
- Liu, Y., A. Nusrat, et al. (2000). "Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia." J Cell Sci **113** ( Pt 13): 2363-74.
- Lockhart, P. J. and J. F. Mercer (2001). "Functional analysis of the sheep Wilson disease protein (sATP7B) in CHO cells." Eur J Cell Biol **80**(5): 349-57.
- Loudianos, G. and J. D. Gitlin (2000). "Wilson's disease." Semin Liver Dis **20**(3): 353-64.
- Lutsenko, S., N. L. Barnes, et al. (2007). "Function and regulation of human copper-transporting ATPases." Physiol Rev **87**(3): 1011-46.
- Lutsenko, S. and J. H. Kaplan (1995). "Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity." Biochemistry **34**(48): 15607-13.
- Lutsenko, S. and M. J. Petris (2003). "Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches." J Membr Biol **191**(1): 1-12.
- Lutsenko, S., K. Petrukhin, et al. (1997). "N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat." J Biol Chem **272**(30): 18939-44.
- Madara, J. L. and J. Stafford (1989). "Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers." J Clin Invest **83**(2): 724-7.
- Mandell, K. J., I. C. McCall, et al. (2004). "Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function." J Biol Chem **279**(16): 16254-62.
- Mandell, K. J. and C. A. Parkos (2005). "The JAM family of proteins." Adv Drug Deliv Rev **57**(6): 857-67.
- Martin-Belmonte, F., R. Puertollano, et al. (2000). "The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines." Mol Biol Cell **11**(6): 2033-45.

- Martinez-Arca, S., V. S. Lalioti, et al. (2000). "Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs." J Cell Sci **113** ( Pt 10): 1705-15.
- Matter, K. and M. S. Balda (2003). "Functional analysis of tight junctions." Methods **30**(3): 228-34.
- Matter, K. and I. Mellman (1994). "Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 545-54.
- Mercer, J. F., J. Livingston, et al. (1993). "Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning." Nat Genet **3**(1): 20-5.
- Michel, H., J. Behr, et al. (1998). "Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 329-56.
- Mitic, L. L. and J. M. Anderson (1998). "Molecular architecture of tight junctions." Annu Rev Physiol **60**: 121-42.
- Miyajima, H., Y. Nishimura, et al. (1987). "Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration." Neurology **37**(5): 761-7.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al. (1997). "Endocytosis." Physiol Rev **77**(3): 759-803.
- Nagano, K., K. Nakamura, et al. (1998). "Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease." Hepatology **27**(3): 799-807.
- Ohno, H., T. Tomemori, et al. (1999). "Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells." FEBS Lett **449**(2-3): 215-20.
- Palacios, S., V. Lalioti, et al. (2001). "Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5-Gln6-Gln7-Ile8 motif." J Biol Chem **276**(5): 3371-83.
- Paladino, S., D. Sarnataro, et al. (2004). "Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins." J Cell Biol **167**(4): 699-709.
- Palmgren, M. G. and K. B. Axelsen (1998). "Evolution of P-type ATPases." Biochim Biophys Acta **1365**(1-2): 37-45.

- Palumaa, P., L. Kangur, et al. (2004). "Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase." Biochem J **382**(Pt 1): 307-14.
- Parton, R. G., B. Joggerst, et al. (1994). "Regulated internalization of caveolae." J Cell Biol **127**(5): 1199-215.
- Pase, L., I. Voskoboinik, et al. (2004). "Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool." Biochem J **378**(Pt 3): 1031-7.
- Paulusma, C. C., P. J. Bosma, et al. (1996). "Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene." Science **271**(5252): 1126-8.
- Pearse, B. M. (1976). "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1255-9.
- Peng, X., B. Grosse, et al. (2006). "How to induce non-polarized cells of hepatic origin to express typical hepatocyte polarity: generation of new highly polarized cell models with developed and functional bile canaliculi." Cell Tissue Res **323**(2): 233-43.
- Petris, M. J. and J. F. Mercer (1999). "The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal." Hum Mol Genet **8**(11): 2107-15.
- Petris, M. J., J. F. Mercer, et al. (1996). "Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking." Embo J **15**(22): 6084-95.
- Petris, M. J., K. Smith, et al. (2003). "Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1." J Biol Chem **278**(11): 9639-46.
- Petris, M. J., D. Strausak, et al. (2000). "The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase." Hum Mol Genet **9**(19): 2845-51.
- Petrukhin, K., S. G. Fischer, et al. (1993). "Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene." Nat Genet **5**(4): 338-43.
- Petrukhin, K., S. Lutsenko, et al. (1994). "Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions." Hum Mol Genet **3**(9): 1647-56.
- Predki, P. F. and B. Sarkar (1992). "Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions." J Biol Chem **267**(9): 5842-6.

- Procopis, P., J. Camakaris, et al. (1981). "A mild form of Menkes steely hair syndrome." J Pediatr **98**(1): 97-9.
- Proud, V. K., H. G. Mussell, et al. (1996). "Distinctive Menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype." Am J Med Genet **65**(1): 44-51.
- Puertollano, R., R. C. Aguilar, et al. (2001). "Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs." Science **292**(5522): 1712-6.
- Puertollano, R., F. Martin-Belmonte, et al. (1999). "The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **145**(1): 141-51.
- Qi, M. and P. H. Byers (1998). "Constitutive skipping of alternatively spliced exon 10 in the ATP7A gene abolishes Golgi localization of the menkes protein and produces the occipital horn syndrome." Hum Mol Genet **7**(3): 465-9.
- Rajasekaran, A. K. and S. A. Rajasekaran (2003). "Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions." Am J Physiol Renal Physiol **285**(3): F388-96.
- Ren, M., G. Xu, et al. (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6187-92.
- Riordan, S. M. and R. Williams (2001). "The Wilson's disease gene and phenotypic diversity." J Hepatol **34**(1): 165-71.
- Rodriguez-Boulán, E., G. Kreitzer, et al. (2005). "Organization of vesicular trafficking in epithelia." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 233-47.
- Rodriguez-Boulán, E. and S. K. Powell (1992). "Polarity of epithelial and neuronal cells." Annu Rev Cell Biol **8**: 395-427.
- Rodriguez-Boulán, E. and C. Zurzolo (1993). "Polarity signals in epithelial cells." J Cell Sci Suppl **17**: 9-12.
- Roelofsen, H., H. Wolters, et al. (2000). "Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion." Gastroenterology **119**(3): 782-93.
- Roh, M. H., C. J. Liu, et al. (2002). "The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions." J Biol Chem **277**(30): 27501-9.



- Rojas, R. and G. Apodaca (2002). "Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 944-55.
- Sai, Y., A. T. Nies, et al. (1999). "Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells." J Cell Sci **112** ( Pt 24): 4535-45.
- Sandoval, I. V., J. J. Arredondo, et al. (1994). "The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes." J Biol Chem **269**(9): 6622-31.
- Sandoval, I. V. and L. Carrasco (1997). "Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179." J Virol **71**(6): 4679-93.
- Sandoval, I. V., S. Martinez-Arca, et al. (2000). "Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP II and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4." J Biol Chem **275**(51): 39874-85.
- Saraste, J., G. E. Palade, et al. (1986). "Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6425-9.
- Sarnataro, D., S. Paladino, et al. (2002). "PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts." Traffic **3**(11): 810-21.
- Scarborough, G. A. (1999). "Structure and function of the P-type ATPases." Curr Opin Cell Biol **11**(4): 517-22.
- Schaefer, M., R. G. Hopkins, et al. (1999). "Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): G639-46.
- Scheiffele, P., J. Peranen, et al. (1995). "N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells." Nature **378**(6552): 96-8.
- Scheiffele, P., M. G. Roth, et al. (1997). "Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain." Embo J **16**(18): 5501-8.
- Shah, A. B., I. Chernov, et al. (1997). "Identification and analysis of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B): population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analyses." Am J Hum Genet **61**(2): 317-28.

- Shanks, M. R., D. Cassio, et al. (1994). "An improved polarized rat hepatoma hybrid cell line. Generation and comparison with its hepatoma relatives and hepatocytes in vivo." J Cell Sci **107** ( Pt 4): 813-25.
- Shin, K., V. C. Fogg, et al. (2006). "Tight junctions and cell polarity." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 207-35.
- Simmen, T., S. Honing, et al. (2002). "AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells." Nat Cell Biol **4**(2): 154-9.
- Simons, K. and S. D. Fuller (1985). "Cell surface polarity in epithelia." Annu Rev Cell Biol **1**: 243-88.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Song, X., Y. Zhao, et al. (2005). "Canonical transient receptor potential channel 4 (TRPC4) co-localizes with the scaffolding protein ZO-1 in human fetal astrocytes in culture." Glia **49**(3): 418-29.
- Soontornmalai, A., M. L. Vlaming, et al. (2006). "Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier." Neuroscience **138**(1): 159-69.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, et al. (1986). "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia." J Cell Biol **103**(3): 755-66.
- Sugimoto, H., M. Sugahara, et al. (2002). "Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells." Mol Biol Cell **13**(7): 2374-82.
- Suzuki, M. and J. D. Gitlin (1999). "Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport." Pediatr Int **41**(4): 436-42.
- Tai, A. W., J. Z. Chuang, et al. (1999). "Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1." Cell **97**(7): 877-87.
- Takeda, T., H. Yamazaki, et al. (2003). "Identification of an apical sorting determinant in the cytoplasmic tail of megalin." Am J Physiol Cell Physiol **284**(5): C1105-13.
- Tanzi, R. E., K. Petrukhin, et al. (1993). "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene." Nat Genet **5**(4): 344-50.

- Terada, K., M. L. Schilsky, et al. (1998). "ATP7B (WND) protein." Int J Biochem Cell Biol **30**(10): 1063-7.
- Thomas, G. R., O. Jensson, et al. (1995). "Wilson disease in Iceland: a clinical and genetic study." Am J Hum Genet **56**(5): 1140-6.
- Tserentsoodol, N., B. C. Shin, et al. (1999). "Immunolocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in the cells of the blood-nerve barrier." Arch Histol Cytol **62**(5): 459-69.
- Tserentsoodol, N., B. C. Shin, et al. (1998). "Colocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in cells of the blood-ocular barrier in the mouse eye." Histochem Cell Biol **110**(6): 543-51.
- Tsivkovskii, R., J. F. Eisses, et al. (2002). "Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells." J Biol Chem **277**(2): 976-83.
- Tsukita, S., M. Furuse, et al. (1999). "Structural and signalling molecules come together at tight junctions." Curr Opin Cell Biol **11**(5): 628-33.
- Ullrich, O., S. Reinsch, et al. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135**(4): 913-24.
- Urban, J., K. Parczyk, et al. (1987). "Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line." J Cell Biol **105**(6 Pt 1): 2735-43.
- Utech, M., A. I. Ivanov, et al. (2005). "Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane." Mol Biol Cell **16**(10): 5040-52.
- Valencia, J. C., H. Watabe, et al. (2006). "Sorting of Pmel17 to melanosomes through the plasma membrane by AP1 and AP2: evidence for the polarized nature of melanocytes." J Cell Sci **119**(Pt 6): 1080-91.
- Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (1997). "Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts." J Cell Sci **110** ( Pt 9): 1113-21.
- Vancampen, D. R. and E. A. Mitchell (1965). "Absorption of Cu-64, Zn-65, Mo-99, and Fe-59 from Ligated Segments of the Rat Gastrointestinal Tract." J Nutr **86**: 120-4.
- Vanderwerf, S. M., M. J. Cooper, et al. (2001). "Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase." J Biol Chem **276**(39): 36289-94.

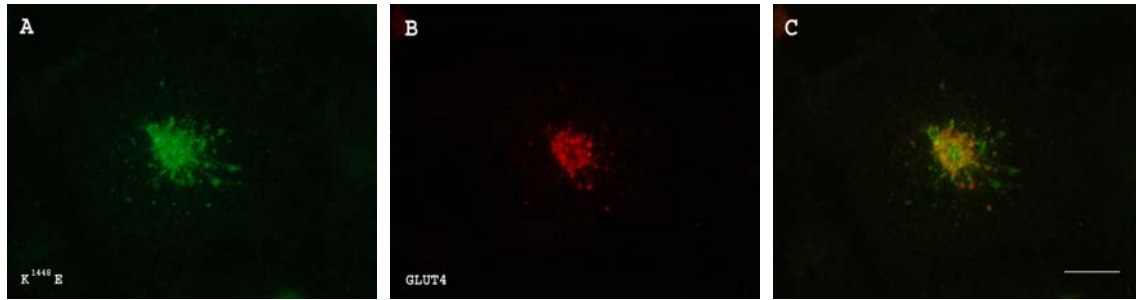
- Vanderwerf, S. M. and S. Lutsenko (2002). "The Wilson's disease protein expressed in Sf9 cells is phosphorylated." Biochem Soc Trans **30**(4): 739-41.
- Verkade, P., T. Harder, et al. (2000). "Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **148**(4): 727-39.
- Vulpe, C., B. Levinson, et al. (1993). "Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase." Nat Genet **3**(1): 7-13.
- Walker, J. M., D. Huster, et al. (2004). "The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1." J Biol Chem **279**(15): 15376-84.
- Wang, Z., K. J. Mandell, et al. (2005). "The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth." Oncogene **24**(27): 4412-20.
- Wehrle-Haller, B. and B. A. Imhof (2001). "Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain." J Biol Chem **276**(16): 12667-74.
- Wernimont, A. K., D. L. Huffman, et al. (2000). "Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins." Nat Struct Biol **7**(9): 766-71.
- Wernimont, A. K., L. A. Yatsunyk, et al. (2004). "Binding of copper(I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone." J Biol Chem **279**(13): 12269-76.
- Wittchen, E. S., J. Haskins, et al. (1999). "Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3." J Biol Chem **274**(49): 35179-85.
- Wong, P. C., D. Waggoner, et al. (2000). "Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2886-91.
- Wood, S. A., J. E. Park, et al. (1991). "Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes." Cell **67**(3): 591-600.
- Yamaguchi, Y., M. E. Heiny, et al. (1993). "Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease." Biochem Biophys Res Commun **197**(1): 271-7.
- Yamaguchi, Y., M. E. Heiny, et al. (1996). "Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14030-5.

- Yamauchi, K., T. Rai, et al. (2004). "Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4690-4.
- Yeaman, C., A. H. Le Gall, et al. (1997). "The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells." J Cell Biol **139**(4): 929-40.
- Zacchi, P., H. Stenmark, et al. (1998). "Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells." J Cell Biol **140**(5): 1039-53.
- Zaitsev, V. N., I. Zaitseva, et al. (1999). "An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma." J Biol Inorg Chem **4**(5): 579-87.
- Zheng, X., D. Lu, et al. (1999). "Apical sorting of bovine enteropeptidase does not involve detergent-resistant association with sphingolipid-cholesterol rafts." J Biol Chem **274**(3): 1596-605.
- Zhou, B. and J. Gitschier (1997). "hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7481-6.

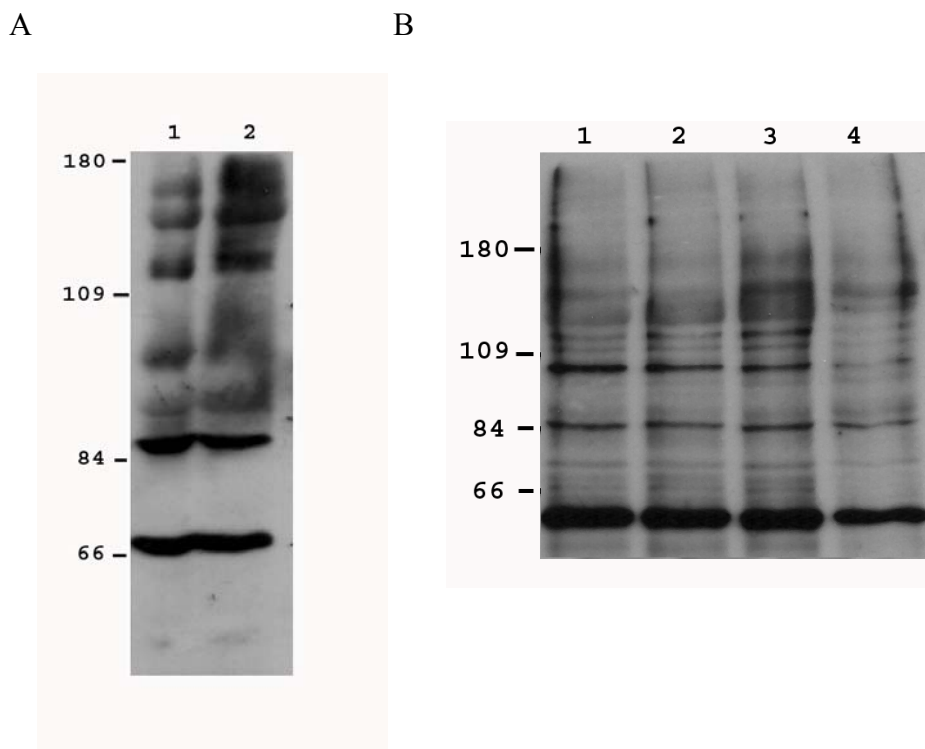
**ANEXO**

---





**Figura S1 | El mutante K<sup>1448</sup>E queda retenido en el compartimento de retención en la TGN.** Células COS-7 fueron transfectadas con los cDNAs del mutante K<sup>1448</sup>E y GLUT4, y posteriormente fijadas y teñidas con el anticuerpos Ab2 4P anti-ATP7B policlonal (panel A, canal FITC) y el anticuerpo monoclonal 1F8 anti-GLUT4 (panel B, canal Texas Red). En el panel C (superposición de canales) puede observarse la codistribución de ambas proteínas en el mismo compartimento, indicando que la mutación en la K<sup>1448</sup> impide la salida del mutante de ATP7B del compartimento donde se aloja en la TGN.



**Figura S2 | Estudio de la reacción del anticuerpos Ab2 4P con ATP7B en lisado de hígado y células WIF B9.** **A.** Sometimes a rat liver lysate (100µg of tissue) was studied by Western Blot to test the reactivity of the antibody Ab2 4P. Lane 1 shows incubation at 37° C, lane 2 shows incubation at 100° C. Observe how the antibody, in addition to detecting ATP7B (~165kD), reacts strongly with a 68kD protein and another of 86kD in rat liver extracts. **B.** Plasma membrane (50µg) of WIF B9 cells subjected to Western Blot and incubated with the antibody Ab2 4P.



Carril 1: control (células WIF B9 incubadas 4h en medio DMEM sin adiciones), carril 2: BCS (células WIF B9 incubadas 4h en medio DMEM con 200 $\mu$ M BCS), carril 3: cobre (células WIF B9 incubadas 4h en medio DMEM con 200 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>), carril 4: células WIF B9 sin diferenciar. Obsérvese como en las 4 condiciones el anticuerpo Ab2 4P reacciona fuertemente con una proteína de unos 64kD, independientemente de si las células han sido incubadas en medio con 200 $\mu$ m BCS o 200 $\mu$ m CuCl<sub>2</sub> previamente al experimento de fraccionamiento.

## ATP7B Copper-Regulated Traffic and Association With the Tight Junctions: Copper Excretion Into the Bile

SONIA HERNANDEZ,\* YO TSUCHIYA,\* JOSEFA P. GARCÍA-RUIZ,† VASSILIKI LALITI,\* SØREN NIELSEN,§  
DORIS CASSIO,|| and IGNACIO V. SANDOVAL\*

\*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, and †Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain; §The Water and Salt Research Center, University of Aarhus, Aarhus, Denmark; and ||Unité INSERM UMR-S757, Université Paris-Sud, Bâtiment, Orsay, Cedex, France

See editorial on page 1255.

**Background & Aims:** The copper transporter ATP7B plays a central role in the elimination of excess copper by the liver into the bile, yet the site of its action remains controversial. The studies reported here examine the correspondence between the site of ATP7B action and distribution and the pathways of copper disposal by the liver. **Methods:** Microscopy and cell fractionation studies of polarized Can 10 cells forming long-branched bile canaliculi have been used to study the cellular distribution of ATP7B. Copper excretion into the bile was studied in perfused rat liver. **Results:** Copper excess provokes a massive download of the ATP7B retained in the trans-Golgi network into the bile canalicular membrane. Furthermore, a stable ATP7B pool is localized to the tight junctions that seal the bile canaliculi. The profile of Cu<sup>64</sup> excretion into the bile by isolated rat livers perfused under one-pass conditions provides evidence of copper excretion by 2 separate mechanisms, transcytosis across the hepatocyte and paracellular transport throughout the tight junctions. **Conclusions:** Whereas the ATP7B retained in the trans-Golgi-network is massively translocated to the bile canalicular membrane in response to increased copper levels, a pool of ATP7B associated with the tight junctions remains stable. In situ studies indicate that copper is excreted into the bile by 2 separate pathways. The results are discussed in the frame of the normal and impeded excretion of copper into the bile.

Bile excretion constitutes the major route of copper disposal in vertebrates and represents the most important homeostatic mechanism for regulating levels of the metal in the organism. Copper ions are exported from liver hepatocytes by a P-type copper ATP translocase, ATP7B. Under basal conditions (ie, low copper levels), ATP7B is intracellularly sequestered in a Golgi compartment within the trans-Golgi network (TGN).<sup>1,2</sup> ATP7B sequestration ends with the increase of cellular copper. However, the ultimate destination of released ATP7B is controversial. The early description of ATP7B

translocation from the TGN to the bile canalicular membrane<sup>3,4</sup> has been challenged by a model that postulates the ATP7B target to late endosomes and the excretion of copper into the bile via the resulting ATP7B-free lysosomes.<sup>5–8</sup> Therefore, an accurate description of the copper-regulated distribution of ATP7B in the hepatocyte is vital to understanding how the cell responds to changes in copper levels and uses the transporter to excrete copper. Dysfunction of ATP7B disrupts copper homeostasis and is responsible for Wilson's disease. Copper is poorly incorporated into ceruloplasmin in the Golgi when the translocase is defective,<sup>9</sup> and excretion is then diminished, leading to sequestration of the metal in lysosomes. As a result, a copper pan-toxicosis typically ensues, severely damaging the liver and central nervous system. Although Wilson's disease is an autosomal recessive disorder due to a defect in ATP7B function, the pathogenesis of 3 types of hepatic copper toxicoses in humans that are not related to ATP7B-dysfunction remains unknown.<sup>10–12</sup> This lack of understanding of pathophysiology points to our limited knowledge of the normal mechanisms for copper disposal in the liver. We here describe that copper induces the massive translocation of intracellular ATP7B to the bile canalicular membrane in vitro in Can 10 hepatoma cells. In addition, we localize a separate and stable pool of ATP7B to tight junctions (TJs) that flank the bile canaliculi (BC). We also report on in situ copper excretion into the bile in perfused rat livers by means of transcytosis through the hepatocyte and paracellular transport throughout the TJs.

### Materials and Methods

#### *In Vitro Response of Hepatocytes to Copper*

The Can 10 cell line, developed in the laboratory of Doris Cassio,<sup>13</sup> is derived from a spheroid culture of rat hepatoma Fao cells. The cells were plated on plastic

**Abbreviations used in this paper:** Ab, antibody; Ap, apical plasma membrane; BC, bile canaliculi; BCS, bathocuproine sulphate; Bs, basolateral plasma membrane; HRP, horseradish peroxidase; LIMP, lysosomal integral membrane protein; TGN, trans-Golgi; TJ, tight junction.

dishes or 10-mm cover glasses at a density of  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured in F12 medium for 5 to 7 days. Upon a stage of simple polarization, these cells formed long tubular branched BC capable of vectorial transport of organic anions and bile acids.<sup>14</sup> Human HepG2 hepatoma cells were also cultured in F12 medium for 5 to 7 days. The copper response was studied by comparing the ATP7B distribution after cell treatment for periods of time between 2 minutes and 4 hours with 50 to 200  $\mu$ mol/L CuCl<sub>2</sub>. In untreated cells, copper was chelated by 4 hours' incubation with 50  $\mu$ mol/L bathocuproine (BCS). The reversal of the copper response was studied after washing the metal and treating the cells for 4 hours with 200  $\mu$ mol/L BCS. BCS and CuCl<sub>2</sub> were provided by Sigma-Aldrich (Sigma Spain, Alcobendas, Madrid, Spain).

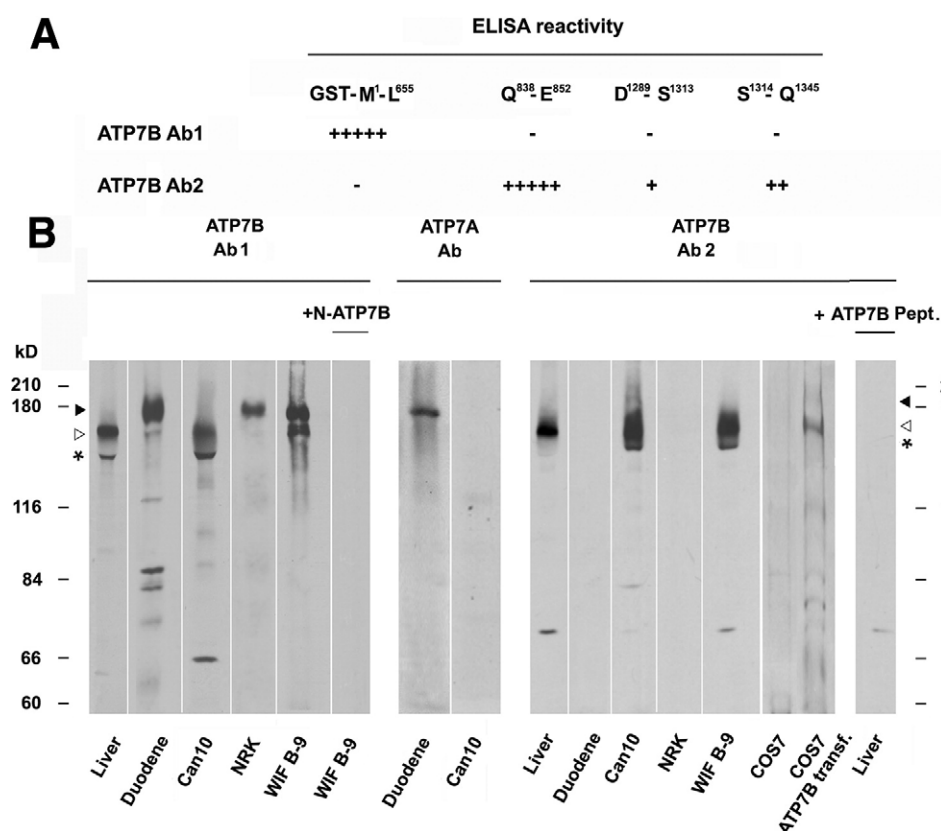
### Antibodies

ATP7B polyclonal antibodies Ab1 and Ab2 were developed to the human N-cytoplasmic domain (aas 1-655) and to 3 synthetic peptides contained in the mouse ATP7B sequence (Q<sup>838</sup>-E<sup>852</sup>, D<sup>1289</sup>-S<sup>1313</sup>, and S<sup>1314</sup>-Q<sup>1345</sup>), respectively. An antibody against the 1-655 aas sequence has been previously developed and used to study ATP7B traffic.<sup>4,15</sup> Ab1 was expected to react with ATP7A and ATP7B given the high homology between their sequences (see Supplementary Table 1; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)). Ab1 was raised in rabbit and mouse and Ab2 only in rabbit. The rabbit polyclonal anti-ATP7A antibody was devel-

oped against four synthetic peptides exclusively found in the human ATP7A sequence (p53-70, p139-163, p1411-1432, p1483-1500). The sequence homology between the N-domains (aas 38-655) of human ATP7B and ATP7A is shown in the supplemental material (see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)). Mouse monoclonal antibody to ZO-1 R26-4C was used as marker of TJs, and mouse monoclonal antibodies to HA4c19 and MRP2 [cMOAT] were used as antibodies to BC membranes. Mouse monoclonal antibody to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase was used as a plasma membrane marker. Antibodies to lysosomal membrane protein LIMP2, trans and cis-Golgi network proteins TGN38 and gp75, syntaxin 6 (Becton Dickinson Spain, Transduction Laboratories, Madrid, Spain), and aquaporin 9 (AQ9A-1; Alpha Diagnostics, San Antonio, TX) were used to study the cellular distribution of ATP7B under different conditions. A detailed reference guide for all these antibodies is provided in the supplemental material (see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)).

### Preparation of Cells, Tissue Lysates, and Fractions

Cell and tissue extracts were prepared in cold buffer A (20 mmol/L Hepes pH 7.4, 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride, 5  $\mu$ g/mL leupeptin, 5  $\mu$ g/mL aprotinin, and 1.5  $\mu$ mol/L pepstatin). Tissues were disrupted



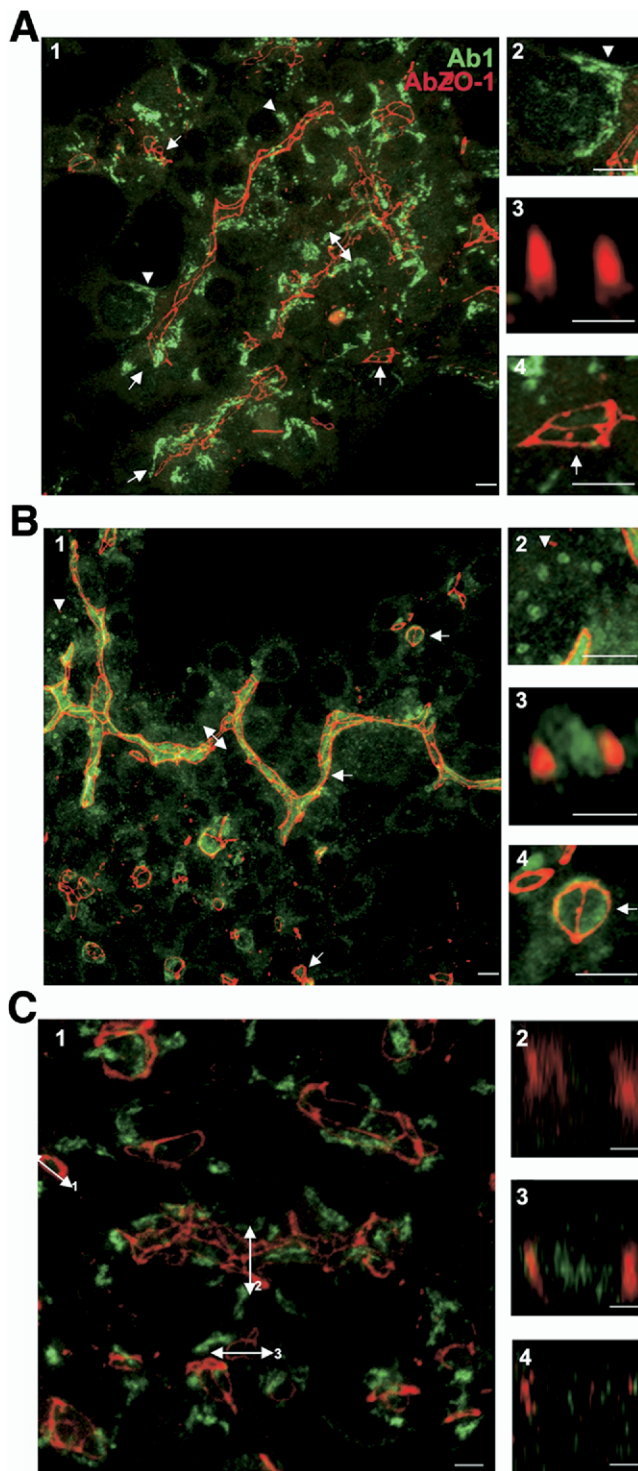
**Figure 1.** Antibodies' Ab1 and Ab2 reaction with ATP7B. (A) Reactivity of Ab1 and Ab2 with the corresponding immunogens GST-human N-ATP7B (M<sup>1</sup>-L<sup>655</sup>) and mouse ATP7B (Q<sup>838</sup>-E<sup>852</sup>, D<sup>1289</sup>-S<sup>1313</sup>, S<sup>1314</sup>-Q<sup>1345</sup>), respectively; antibody reactivity was measured by ELISA. (For more details, see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org).) (B) Reaction specificity of Ab1 and Ab2. Whole postnuclear membranes (100  $\mu$ g) from tissues and cells were subjected to Western analysis using affinity-purified Ab1 and Ab2. When indicated, Ab1 was preincubated overnight at 4°C with 20  $\mu$ g of the corresponding immunogens (+ N-ATP7B, + ATP7B peptide). Note the reaction of Ab1 with ATP7B (white arrowhead) and ATP7A (black arrowhead) and, in contrast, the exclusive reaction of Ab2 with ATP7B. The asterisk-marked protein was an ATP7B proteolytic product that increased with sample manipulation and storage.

using a Potter Evehjem homogenizer. Can 10 cells grown on p100 dishes were resuspended in 2-mL buffer A and passed 20 times through a cell cracker equipped with a 0.2500-inch-diameter ball. Lysates were centrifuged for 5 minutes at  $600 \times g$  to remove nuclei and cell debris; whole membranes were prepared by centrifugation for 90 minutes at  $150,000 \times g$ . TGN- and BC-rich fractions were prepared from Can 10 cells as follows: Postnuclear supernatants were centrifuged at  $20,000 \times g$  for 20 minutes

using a TL100.3 rotor in a TL100 ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA), and the resulting pellet and supernatant were used to purify BC and the Golgi-rich low-density microsomes, respectively. To this end, the pellet was resuspended in 0.5-mL buffer A and laid over a 1-mL 35% sucrose cushion prepared in the same buffer. BC were then collected by centrifugation for 1 hour at  $108,000 \times g$  using a swinging TLS 55 rotor. A fraction rich in TGN was separately collected by centrifugation of the  $20,000 \times g$  supernatant for 90 minutes at  $180,000 \times g$ . Apical (Ap) and basolateral (Bs) plasma membrane domains were subfractionated and purified from rat liver as described elsewhere.<sup>16</sup> By using this method, we found that Ap membranes enriched in the HA4 marker floated on top of the 31% (wt/wt); Bs membranes were recovered in the 34%/38% sucrose interphase.

### Immunofluorescence Microscopy and Western Analysis

All experiments were performed a minimum of 3 times using affinity-purified ATP7B and ATP7A antibodies. Conventional and confocal immunofluorescence microscopy was performed using an Axiovert 135M microscope (Carl Zeiss Spain, Tres Cantos, Madrid, Spain) or a Bio-Rad Radiance 2000 microscope with the argon (488 nm) and helio/neon (543 nm) lasers (Bio-Rad Spain, Alcobendas, Madrid, Spain) set to 3 and 100 percent of maximal intensity, respectively and with the iris aperture set to optimum. Can 10 cells were grown on 10-mm cover glass and fixed-permeabilized with cold ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) methanol for 4 minutes. Alexa 488- and 647-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgGs (Invitrogen Spain, Prat de Llobregat, Barcelona, Spain) were used as secondary antibodies. For Western analysis, whole membranes were prepared by centrifugation of postnuclear supernatants at  $150,000 \times g$  for 90 minutes. The membrane proteins ( $100 \mu\text{g}$ ), resolved by electrophoresis in 12-cm-long SDS 10% or 8% polyacrylamide gels, were blotted onto nitrocellulose and subjected to Western analysis using sepa-



**Figure 2.** Copper-induced translocation of ATP7B from the Golgi to the bile canalicular membrane. Polarized Can 10 cells were grown for 7 days and incubated with either BCS (A) or CuCl<sub>2</sub> (B) (for details, see Materials and Methods). After fixation-permeabilization, the cells were double-immunostained for ATP7B with Ab1 (FITC, green) and for the TJ protein ZO-1 with antibody R26-4C (Texas red). In cells treated with BCS, the bulk of ATP7B was retained in the Golgi (A1, A2, arrowheads) and excluded from the bile canalicular membrane (A1, A3, A4 arrows; A3, orthogonal viewing of z-series stacks from the plane marked with a double-arrowhead in A1). After treatment with CuCl<sub>2</sub>, the bulk of ATP7B was released from the Golgi and found in a few vesicles (B1, B2, arrowheads) and in the bile canalicular membrane (B1, B4 arrows; B2 orthogonal viewing of z-series stacks from the plane marked with a double arrowhead in B1). Most of the ATP7B was returned to the Golgi after washing the copper and treating the cells for 4 hours with 200  $\mu\text{mol/L}$  BCS in the presence of 10  $\mu\text{mol/L}$  cycloheximide (C1; C2-C4, orthogonal viewing of z-series stacks from the planes marked with a double arrowhead in C1). (Bars are 15  $\mu\text{m}$ , except in panels A3 and B3, where they are 75  $\mu\text{m}$ .)



rately affinity-purified ATP7B and ATP7A antibodies diluted 1/500. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated to donkey anti-rabbit IgG was used as a second antibody (GE Healthcare Spain, Alcobendas, Madrid, Spain).

## Liver Perfusion

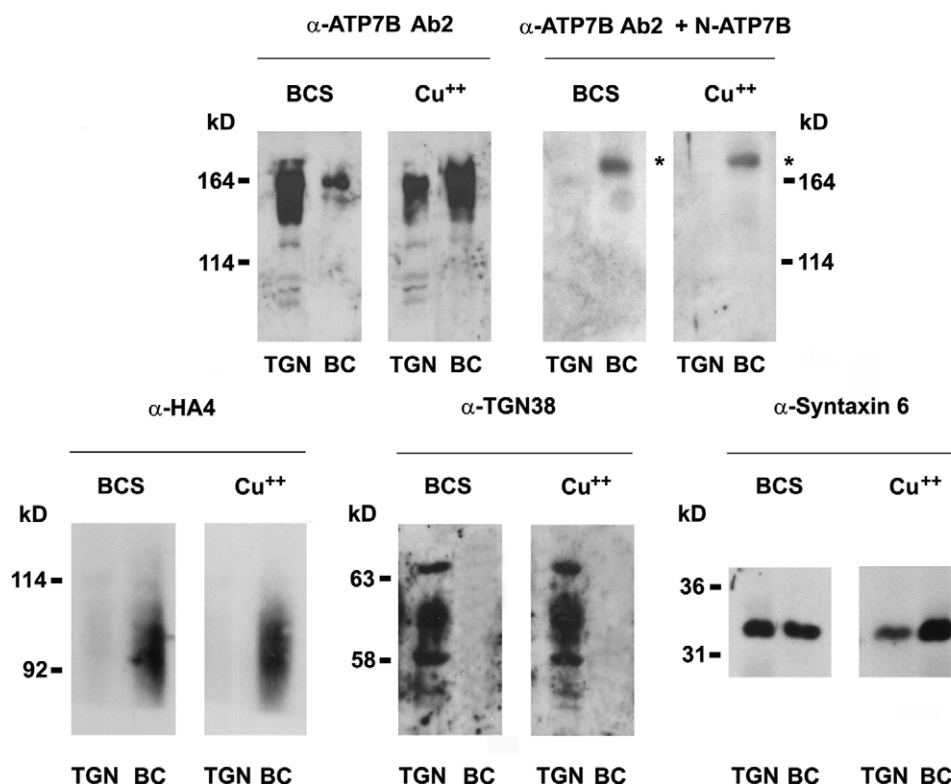
Male Wistar rats weighing 300 g were anesthetized using 45 mg ketolar, 0.5 mg valium, and 0.1 mg atropine. Following bile duct cannulation, livers were isolated in situ and perfused at a constant flow rate of 15 to 17 mL/min with 150 mL of freshly prepared cell-free Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, pH 7.4<sup>17</sup> containing 5 mmol/L glucose, 2 mmol/L glutamine, nonessential amino acids, and 1% (wt/vol) bovine serum albumin (fraction V; Boehringer Ingelheim Spain, Sant Cugat del Vallès, Barcelona, Spain). The perfusion solution was recycled, gassed continuously with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1), and maintained at 37°C as previously described.<sup>17</sup> The paracellular and transcellular transport of copper across liver parenchymal tissue from blood to bile was monitored by studying its coexcretion with the inulin and HRP (first wave) transported through the paracellular pathway and the HRP (second wave) transported through the transcellular pathway.<sup>21</sup> Solutions of 200  $\mu$ Ci Cu<sup>64</sup> (Nordion, Quebec, Canada; specific activity, 5 Ci/mg) or 50  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H] inulin (specific activity, 0.5 mCi/mg) mixed with 4 mg HRP (Sigma type VI, prepared in solution the night before and maintained at 4°C) were prepared in 0.3-mL perfusion medium and injected into the perfusion line just before the portal vein cannula. Immediately before the infusion, the perfusion circuit was opened, and the

injection was performed while collecting the medium surging from the liver (1-pass perfusion). Next, the organ was washed with 80-mL perfusion medium before closing the circuit and resuming the perfusion. Livers infused with Cu<sup>64</sup> were perfused with 1.1 mg CuCl<sub>2</sub>/L. To study the effect of the ATP7B sequestration in the TGN on copper excretion into the bile, the livers were perfused for 90 minutes with 2 mmol/L BCS and then, immediately before the Cu<sup>64</sup> infusion, were washed with 80-mL drug-free medium containing 1.1 mg/L CuCl<sub>2</sub>; the perfusion was resumed with 2 mmol/L BCS 2 minutes after the Cu<sup>64</sup> infusion. The mean bile flow was 14  $\mu$ L/minute. Bile was collected every 2 minutes to measure the rates of excretion of Cu<sup>64</sup>, [<sup>3</sup>H] inulin, and HRP. Cu<sup>64</sup> and [<sup>3</sup>H] inulin were measured using an LKB 1219 Rackbeta counter (Perkin-Elmer Life Sciences, Regensdorf, Switzerland), and the HRP activity was calculated colorimetrically, as previously described.<sup>18</sup> Animals were treated according to the ethical guidelines issued by the Ministerio de la Presidencia Español, October 10th, 2005.

## Results

### Identification of ATP7B With Specific Antibodies

We developed 2 antibodies to ATP7B. Antibody-1 (Ab1), raised to the GST-N-ATP7B (aas 1-655) construct (for more details, see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)), reacted with ATP7B in liver and Can 10 hepatoma cells (Figure 1), but also recognized the homologous and ubiquitous copper transporter ATP7A in tissues and cells of nonhepatocyte origin. As a result,



**Figure 3.** ATP7B distribution between trans-Golgi and BC-enriched fractions from Can 10 cells is copper dependent. Polarized Can 10 cells incubated with 50  $\mu$ mol/L BCS or 200  $\mu$ mol/L CuCl<sub>2</sub> were fractionated to separate the TGN sequestration compartment from the BC. HA4 and TGN38 are markers of bile canalicular membranes and TGN, respectively. Syntaxin 6, a t-SNARE released with ATP7B from the TGN in response to increased copper levels, was used to double-check the copper response. Observe in the Western analysis that the bulk of ATP7B was recovered in the TGN38/syntaxin 6-rich TGN fraction of cells treated with BCS and that a small but significant amount was recovered in the HA4-positive bile canalicular fraction. Preincubation of Ab1 with the N-ATP7B immunogen inhibited the Ab1 reaction with ATP7B and resulted in an unspecific reaction of the antibody with a 125-kD protein (\*).

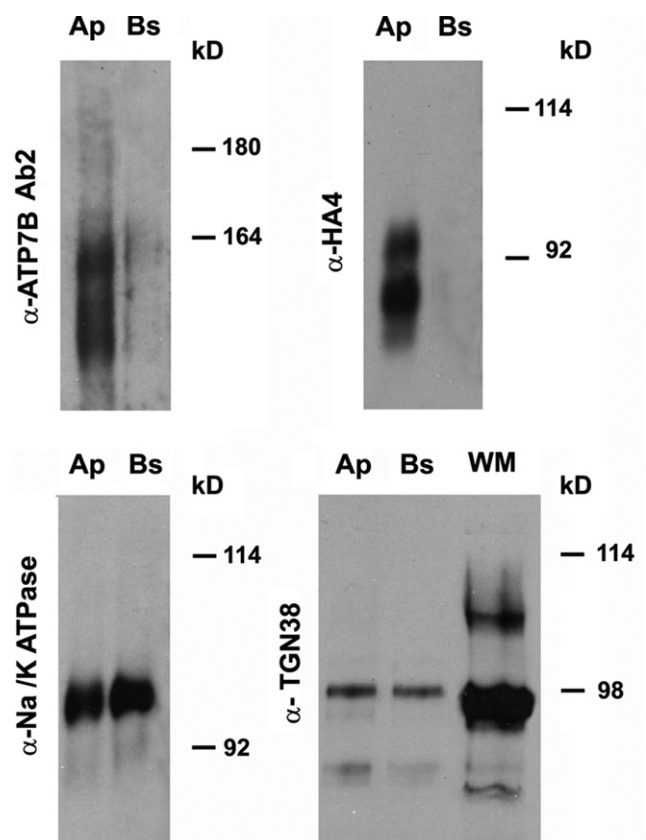
this antibody recognized ATP7B and ATP7A in lysates of WIF B-9 cells, a hybrid of rat hepatoma human fibroblasts and COS cells transfected with ATP7B (Figure 1). The reaction between Ab1 and ATP7B/ATP7A was abolished by preincubation of the antibody with GST-N-ATP7B. In contrast, antibody-2 (Ab2) strongly recognized the extracellular loop linking the 5 and 6 transmembrane domains of ATP7B (see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)) and reacted only with ATP7B. This reaction was blocked by preincubation of the antibody with the peptides used for immunization (Figure 1). An anti-ATP7A antibody that recognized the protein in duodenum did not react with any membrane protein species in Can 10 cells, thus indicating no expression of ATP7A in those cells.

#### **ATP7B Translocation in Response to Excess Copper as Shown by Microscopy and Cell Fractionation**

Can 10 cells forming long-branched BC were incubated with either BCS or CuCl<sub>2</sub>.<sup>13</sup> Immunohistochemical staining showed that copper induced the vectorial translocation of ATP7B from the TGN<sup>2</sup> (Supplementary Figure 1; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)) to the bile canalicular membrane (Figure 2, compare panels A, B). Furthermore, upon addition of 50  $\mu$ mol/L CuCl<sub>2</sub>, release of ATP7B from the Golgi was rapid, and within 10 minutes, the transporter was partly relocated to large vesicles scattered throughout the cytoplasm (Supplementary Figure 2; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)). Moreover, appearance of ATP7B in large vesicles and in the Rab11-positive subapical compartment (Supplementary Figure 2; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)) preceded the massive download of ATP7B into the bile canalicular membrane (Figure 2B). This was flanked by the ZO-1-positive TJs (Figure 2B) and immunostained with antibodies against the apical membrane marker MRP2 (Supplementary Figure 2E; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)). Translocation of ATP7B from the TGN to the plasma membrane also occurred in simply polarized Can 10 cells, a stage that preceded the formation of BC (Supplementary Figure 3; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)).

Furthermore, in a reverse experiment, the washout of copper and incubation with BCS, in the presence of cycloheximide, dramatically reversed the translocation direction and resulted in massive return and retention of ATP7B in the Golgi (Figure 2C). These results proved that excess copper induced the download of ATP7B into the bile canalicular membranes of fully polarized Can 10 cells and that a decrease in copper levels induced a reversal of this traffic, returning ATP7B to the TGN. The sequestration of ATP7B in the TGN of cells with low copper levels and the copper-induced download of ATP7B into the canalicular membrane was separately studied by cell fractionation ex-

periments using Can 10 cells incubated 4 hours with 50  $\mu$ mol/L BCS or 200  $\mu$ mol/L CuCl<sub>2</sub>. Whereas the bulk of ATP7B was recovered with the TGN38-rich Golgi fraction of the cells treated with BCS, the addition of copper provoked the ATP7B translocation to the HA4-rich bile canalicular membrane fraction (Figure 3). Furthermore, after increases in the copper levels, syntaxin 6, a t-SNARE involved in exocytosis and resident under basal conditions in the TGN (Supplementary Figure 1; see supplemental material online at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org)), was found in high concentrations in the canalicular membrane fraction (Figure 3). Therefore, the microscopy and cell fractionation studies demonstrated that ATP7B was sequestered in the Golgi of Can 10 cells with low copper levels but extensively downloaded into the bile canalicular membrane in the presence of excess copper. The distribution of ATP7B was also studied in rat liver. The results of



**Figure 4.** ATP7B is recovered with apical plasma membrane purified from rat liver. The presence of ATP7B and the markers of BC HA4, plasma membrane Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and trans-Golgi TGN38, was scrutinized in Ap and Bs plasma membrane-enriched fractions purified from normal rat liver. TGN38 was also studied in whole membranes (WM). Ten micrograms of membrane protein was resolved by electrophoresis in SDS-PAGE using 8% polyacrylamide and after their blotting onto nitrocellulose subjected to Western analysis using specific antibodies. Note the accumulation of ATP7B in the HA4-enriched/TGN38-poor Ap fraction and its exclusion from the Bs fraction. Whole purified plasma membrane as well as Ap and Bs plasma membrane fractions were lysosome-free as shown by the lack of the lysosomal marker LIMP-II (not shown). The experiment was repeated 3 times with comparable results.

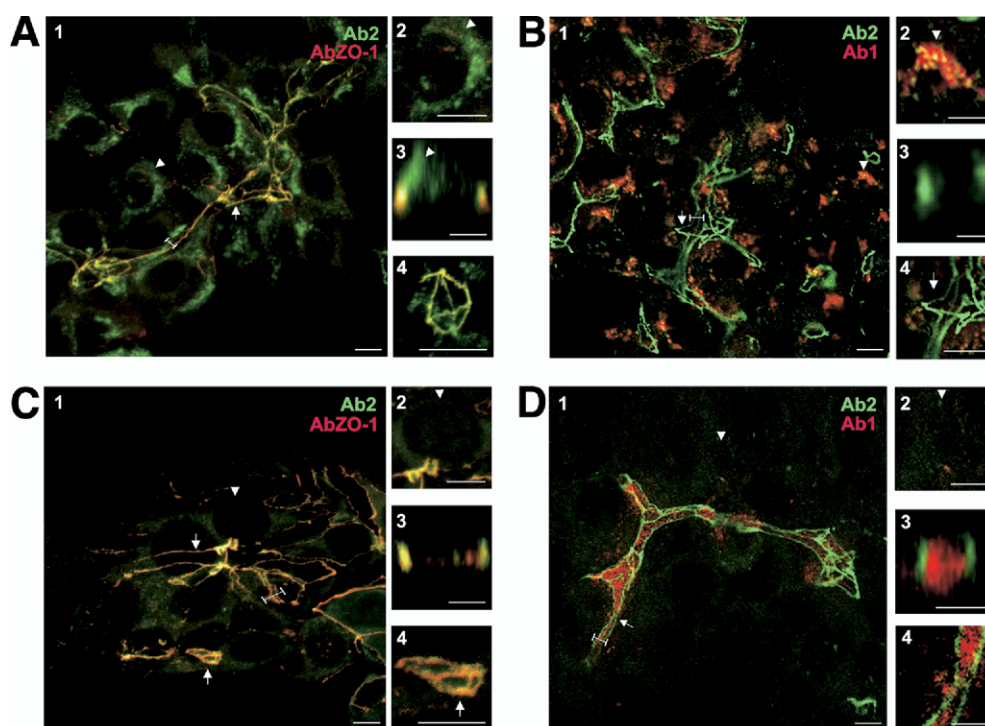
Western studies showed that the bulk of the copper transporter associated with the plasma membrane was recovered with the apical plasma membrane fraction enriched in the HA4 bile canalicular membrane marker and separated from basolateral membrane and TGN elements (Figure 4). This result was consistent with the presence of ATP7B in the bile canalicular membrane of rat liver.

### **Localization of a Stable ATP7B Pool to the TJs of Polarized Can 10 Cells and of Rat Hepatocytes**

In Can 10 cells treated for 4 hours with 50  $\mu\text{mol/L}$  BCS, Ab2 to ATP7B not only reacted with the Golgi (as expected) but also with the TJs flanking the bile canalicular membranes (Figure 5A and B). Furthermore, the staining of the TJs by Ab2 was comparable after treatment of the cells for 4 hours with 50  $\mu\text{mol/L}$  CuCl<sub>2</sub> (Figure 5C and D). These observations and the specific reaction of Ab2 with ATP7B (as shown in Figure 1) demonstrated the association of a population of ATP7B molecules within the TJs. In striking contrast to Ab1, Ab2 did not react with the ATP7B translocated to the bile canalicular membrane (Figure 5C and D), and as a result, double-staining of BC by Ab1 and Ab2 was complementary in cells treated with excess CuCl<sub>2</sub> (Figure 5M–P). Next, we studied the distribution of ATP7B in rat liver

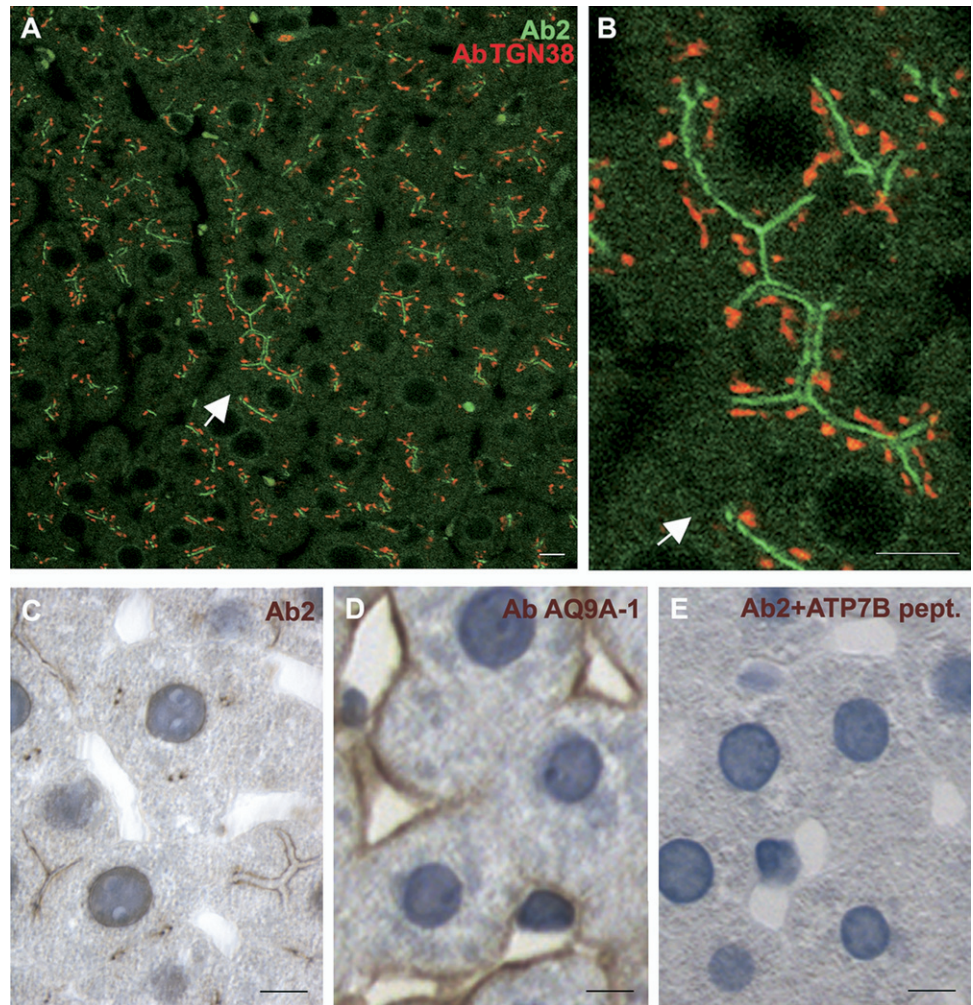
slices stained with Ab2. In agreement with the results of the Can 10 studies, Ab2 specifically stained the TJs between hepatocytes as shown in the en face sections and cross sections of BC (Figure 6). These in situ findings on microscopy confirmed the association of ATP7B with the TJs observed in vitro in the Can 10 cells.

Copper is excreted into the bile by separate paracellular and transcellular mechanisms. Because ions are transported from blood into the bile by transcytosis and paracellular transport through the TJs, we studied the mechanisms of copper excretion into the bile by monitoring its appearance in the bile after infusion of Cu<sup>64</sup> into the portal vein of the perfused liver. The study was performed operating under 1-pass conditions. We found that the excretion time of a substantial amount of Cu<sup>64</sup> coincided with the first wave of HRP and slightly preceded the elimination of inulin, 2 markers of paracellular transport across the TJs<sup>19</sup> (compare Figure 7A and B). In 3 separate experiments, the early wave of Cu<sup>64</sup> in the bile was detected 9 minutes after its infusion and peaked 9 minutes later. This first wave clearly preceded a second one that lasted longer and partly overlapped with the wave of HRP excreted after transcytosis through the hepatocyte<sup>19</sup> (compare Figure 7A and B). Furthermore, the first wave of excreted Cu<sup>64</sup> was unaffected by a 90-minute liver perfusion with 2 mmol/L BCS (aimed to



**Figure 5.** Localization of ATP7B to ZO-1-positive TJs. Can 10 cells incubated with either BCS (A, B) or CuCl<sub>2</sub> (C, D). The fixed-permeabilized cells were double immunostained with rabbit polyclonal Ab2 (FITC) and either the mouse monoclonal to ZO-1 or the mouse polyclonal Ab1 (Texas red) as indicated in the panels. Panels 2 through 4 show magnifications of areas containing the Golgi or BC. Panel 3 shows orthogonal views of z-series stacks taken at the sites marked with white bars. ATP7B is retained in the perinuclear area (ie, Golgi) of cells treated with BCS (A1, A2, B1, B2, arrowheads). The staining of the ZO-1-positive TJs flank long and short BC with Ab2, and this staining was unaffected by the changes in the levels of copper (Compare A, B and C, D). Note the staining of the Golgi by Ab1 and Ab2 in cells treated with BCS (A, B) and the negligible reaction of Ab2 with the bile canalicular membrane in cells treated with copper (C, D). (All bars = 15  $\mu\text{m}$ , except C3, 51  $\mu\text{m}$ ; B2, D4, 7.5  $\mu\text{m}$ ; B3, 38  $\mu\text{m}$ ; D3, 60  $\mu\text{m}$ .)





**Figure 6.** ATP7B is found in the tight junctions of rat liver. Sections from normal rat liver were immunostained for ATP7B using Ab2, TGN, and basolateral aquaporin 9 (as indicated in the panels) using as second antibodies FITC, Texas red, and HRP-conjugated rabbit and mouse IgGs. Note the strong staining of the BC walls in both enface and cross-sectional views (A, magnified in B; C). Observe the distribution of TGN dictyosomes along the BC (A, B). Note that surface staining of hepatocytes by Ab2 and the antibody to aquaporin 9 was complementary (C, D). Preincubation of Ab2 with the 3 peptides used as immunogens (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) inhibited the BC staining (ie, tight junctions) (E). The results shown are representative of 3 separate experiments. (Bars = 15  $\mu\text{m}$ .)

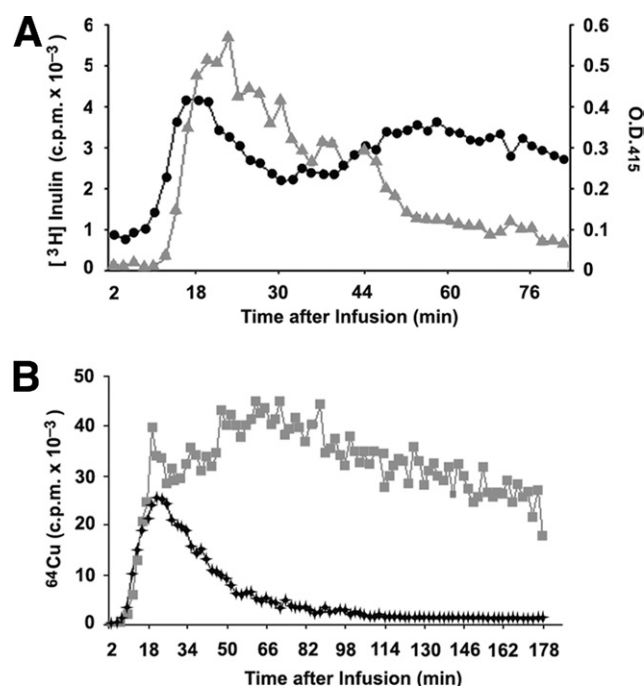
remove ATP7B from the bile canalicular membrane and induce its sequestration in the Golgi); however, the second wave of excreted copper was dramatically reduced by BCS (Figure 7B). This result and the sequestration of ATP7B in the Golgi of the cells treated with BCS (Figures 2 and 5) indicated that the second wave of copper excretion was a result of transcytosis. These observations strongly indicated that copper was excreted into the bile by separate paracellular and transcellular mechanisms.

## Discussion

Our studies provide evidence for the existence of 2 separate pools of ATP7B in the membranes of BC and hepatocyte TJs and show that excretion of copper by the liver into the bile occurs by separate paracellular and transcellular mechanisms. We observed a striking and useful contrast between the properties of Ab1 and Ab2. Ab1 recognized ATP7B retained in the Golgi and translocated to the bile canalicular membrane, while Ab2 recognized ATP7B in the Golgi and TJs. However, these antibodies have indistinguishable reactions with blotted ATP7B protein. This difference between their reactivity in situ and in vitro points to a relationship between reac-

tivity and location that may result from epitope masking. Such epitope masking is probably due to ATP7B modifications or more likely its interaction with other proteins at specific locations. It would be therefore interesting to study the possible modifications of the ATP7B molecules retained in the cell surface as well as the mechanisms of their segregation between the bile canalicular membrane and the tight junctions. The initial description of the download of ATP7B into the BC of HepG2 cells incubated with copper<sup>3</sup> has been followed by studies with contradictory results. These subsequent studies resulted in a model that excludes ATP7B from the BC and describes biliary copper excretion by ATP7B-mediated pumping of copper into endosomes followed by the fusion of copper-loaded lysosomes with the canalicular membrane.<sup>6,8</sup> Furthermore, reports that ATP7B does not translocate to the plasma membrane of fibroblasts treated with copper appear to fit with the observations made in hepatoma cells. However, partial localization of ATP7B at the apical membrane of WIF-B9 cells after treatment with copper has also been reported.<sup>4</sup> More recently, the lining of BC with ATP7B-positive vesicles in HepG2 cells has been discussed as proof of the transient





**Figure 7.** Copper is excreted by the liver into the bile through separate paracellular and transcellular pathways. Isolated perfused rat livers were infused with [<sup>3</sup>H]inulin (100  $\mu$ Ci, specific activity 0.5 mCi/mg, triangle), HRP (4.5 mg  $\bullet$ ), or <sup>64</sup>Cu (0.25 mCi, specific activity 5 Ci/mg, square) at time zero (infusion time, 15 seconds; volume infused 0.3 mL) under one-pass conditions. When required, the livers infused with <sup>64</sup>Cu were perfused with 2 mmol/L BCS before (90 minutes) and after the <sup>64</sup>Cu infusion ( $\blacktriangle$ ). Bile samples were collected from the bile duct every 2 minutes after the infusions. The graphs show the concentrations of each of these substances in the excreted bile, over time. Taking into account the volume of the bile duct cannula (123  $\mu$ L), the mean bile flow of 14  $\mu$ L/minute, and the 35- $\mu$ L volume of the biliary tree,<sup>26</sup> there was a delay in these experiments of about 6 to 7 minutes between the entrance of <sup>64</sup>Cu, inulin, and HRP in the BC tree and their appearance in the bile samples. The profiles of inulin, HRP, and copper excretion by untreated and bathocuproine-treated livers were studied in groups of 3 experiments. The excretion profile within each group was the same.

presence of small amounts of ATP7B in the bile canalicular membrane.<sup>15</sup> Our studies of Can 10 cells show that ATP7B is massively translocated from the Golgi to the BC upon increase in copper levels. They confirm the results from Vonk's laboratory in HepG2 cells, that at increased copper levels, ATP7B redistributes to apical vacuoles reminiscent of BC. The massive presence of ATP7B in the bile canalicular membrane of cells incubated with excess copper strongly suggests that ATP7B functions in the membrane to pump copper into the bile. We further assessed this pouring of ATP7B into the bile canalicular membrane of Can 10 cells treated with copper by demonstrating ATP7B's codistribution with the bile canalicular membrane markers MRP2 and HA4 and the flanking of the ATP7B-positive membranes by the TJ's marker ZO-1. The existence of 2 separate pools of ATP7B, 1 trafficking in a copper-regulated manner between the Golgi and BC and a second that appears more stable in the TJs, raises the question of the relationship between ATP7B location and function. Whether the ATP7B re-

tained in the TJs is involved in paracellular transport of copper into the bile is nevertheless uncertain. The coincidence between the paracellular excretion of HRP and inulin and the appearance of the first wave of infused Cu<sup>64</sup> in the bile suggests that a significant amount of copper is paracellularly transported. Furthermore, this conclusion is strongly supported by the insensitivity of the copper coexcreted with inulin to pretreatment of the liver with BCS, treatment that strongly inhibits the second wave of excreted copper transported through the hepatocyte. Whereas transporters and pumps function in transcellular transport of organic compounds and ions into the bile, paracellular transport through TJs has been firmly demonstrated to result from passive movement of solutes and water down electrochemical gradients through claudin-based barriers.<sup>20</sup> The transport of ions both by paracellular and transcellular mechanisms is not an uncommon phenomenon and has been explained by the saturation of cellular transporters and the lack of saturation of the paracellular pathway over a large concentration range. Involvement of ATP7B in the paracellular transport of copper would require its reorientation in a position perpendicular to that of the molecules retained in the plasma membrane, with the copper binding sites exposed to the lumen of the blood sinusoids. Furthermore, the ubiquitousness of the claudin barriers would necessitate insertion of ATP7B within the structural framework made of the claudin pores. Alternatively, the ATP7B pump lodged at the TJs might function either as a safe valve to maintain intracellular copper below toxic levels under basal conditions or as part of a copper-based mechanism that regulates the functioning of TJs. This function of ATP7B in the TJs may be similar to the regulation of paracellular permeability by the unconventional complex Kir6.1-SUR2A, 2 members of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels.<sup>21</sup> Like the K<sup>+</sup> channels in the cerebellar pinceaux, ATP7B channels in the apical side of the TJs may attribute a positive charge to the inner claudins, decreasing the influx of cations and increasing the efflux of anions through the claudin pores.<sup>22</sup> The mixing ratios of claudins in a given type of cell appear to determine barrier property in terms of charge selectivity, thus, new information on the claudins ratio in liver could be critical to understand how ATP7B channels regulate paracellular transport in the liver. Furthermore, the backbone of the TJs is formed by claudins connected to a scaffold that transmits regulatory signals and fastens the claudins to the cytoskeleton.<sup>23</sup> The interaction of ATP7B with the ZO-1 scaffold (our unpublished results) raises the possibility that it may act as a transducer that couples changes in copper levels to structural and functional changes in the TJs. Further research is also needed to determine whether copper excreted through the paracellular pathway is or is not bound to albumin or histidine. Because of the short transit from the intestine to the liver along the portal vein, these carriers may not have sufficient time to react with all the copper absorbed in the

gastrointestinal tract. Although the implication of the COMMD1/MURR1 gene in the copper toxicosis of Bedlington terriers remains controversial,<sup>24,25</sup> if confirmed, it would be interesting to know if the COMMD1/MURR1 mutations interfere with the protein ability to inhibit NF- $\kappa$ B and stimulate the synthesis of the TJs' components that may be required for the correct functioning of the ATP7B associated with TJs. With regard to ATP7B dysfunction and disease, it would be interesting to know whether TJ dysfunction is implicated in some of the 3 of non-Wilsonian copper toxicosis described in humans.<sup>10–12</sup>

## Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.043.

## References

- Yang XL, Miura N, Kawarada Y, et al. Two forms of Wilson disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments. *Biochem J* 1997;326(Pt 3):897–902.
- Lockhart PJ, Mercer JF. Functional analysis of the sheep Wilson disease protein (sATP7B) in CHO cells. *Eur J Cell Biol* 2001;80:349–357.
- Roelofs H, Wolters H, Van Luyn MJ, et al. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* 2000;119:782–793.
- Guo Y, Nyasae L, Braiterman LT, et al. NH<sub>2</sub>-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G904–916.
- Harada M, Sakisaka S, Terada K, et al. Role of ATP7B in biliary copper excretion in a human hepatoma cell line and normal rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2000;118:921–928.
- Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, et al. Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol* 1999;276:G639–646.
- Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, et al. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 2007;87:1011–1146.
- Harada M, Kumemura H, Sakisaka S, et al. Wilson disease protein ATP7B is localized in the late endosomes in a polarized human hepatocyte cell line. *Int J Mol Med* 2003;11:293–298.
- Cox DW. Genes of the copper pathway. *Am J Hum Genet* 1995;56:828–834.
- Wijmenga C, Muller T, Murli IS, et al. Endemic Tyrolean infantile cirrhosis is not an allelic variant of Wilson's disease. *Eur J Hum Genet* 1998;6:624–628.
- Muller T, van de Sluis B, Muller W, et al. Non-Indian childhood cirrhosis. *Eur J Med Res* 1999;4:293–297.
- Maggiore G, De Giacomo C, Sessa F, et al. Idiopathic hepatic copper toxicosis in a child. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987;6:980–983.
- Peng X, Grosse B, Le Tiec B, et al. How to induce non-polarized cells of hepatic origin to express typical hepatocyte polarity: generation of new highly polarized cell models with developed and functional bile canaliculi. *Cell Tissue Res* 2006;323:233–243.
- Cassio D, Macias RIR, Grosse B, et al. Expression, localization, and inducibility by bile acids of hepatobiliary transporters in the new polarized rat hepatic cell lines, Can 3–1 and Can 10. *Cell Tissue Res* 2007;330:447–460.
- Bartee MY, Lutsenko S. Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biomaterials* 2007;20:627–637.
- Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, et al. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol* 1984;98:991–1000.
- Hems R, Ross BD, Berry MN, et al. Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J* 1966;101:284–292.
- Pinna MC, Bauduin P, Touraud D, et al. Hofmeister effects in biology: effect of choline addition on the salt-induced super activity of horseradish peroxidase and its implication for salt resistance of plants. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* 2005;109:16511–16514.
- Lowe PJ, Kan KS, Barnwell SG, et al. Transcytosis and paracellular movements of horseradish peroxidase across liver parenchymal tissue from blood to bile. Effects of alpha-naphthylisothiocyanate and colchicine. *Biochem J* 1985;229:529–537.
- Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006;68:403–429.
- Jons T, Wittschieber D, Beyer A, et al. K<sup>+</sup>-ATP-channel-related protein complexes: potential transducers in the regulation of epithelial tight junction permeability. *J Cell Sci* 2006;119:3087–3097.
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 2004;127:1386–1390.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:207–235.
- van de Sluis BJ, Breen M, Nanji M, et al. Genetic mapping of the copper toxicosis locus in Bedlington terriers to dog chromosome 10, in a region syntenic to human chromosome region 2p13-p16. *Hum Mol Genet* 1999;8:501–507.
- Wu ZY, Zhao GX, Chen WJ, et al. Mutation analysis of 218 Chinese patients with Wilson disease revealed no correlation between the canine copper toxicosis gene MURR1 and Wilson disease. *J Mol Med* 2006;1–5.
- Olson JR, Fujimoto JM, Peterson RE. Three methods for measuring the increase in the capacity of the distended biliary tree in the rat produced by alpha-naphthylisothiocyanate treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977;42:33–43.

Received October 10, 2007. Accepted January 10, 2008.

Address requests for reprints to: Ignacio V. Sandoval, MD, PhD, CIBEREHD, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid; e-mail: [isandoval@cbm.uam.es](mailto:isandoval@cbm.uam.es); fax: (34) 91 196 4678.

S. H., Y. T., and J.P.G.-R. contributed equally to this work.

Supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia from the Spanish Government (BFU-2005-07903; GEN2003-20662-C07-06) and the Instituto de Salud Carlos III (CIBEREHD) to I.V.S.

The authors report they have no conflicts of interest to disclose.

The authors thank Dr Luis Alvarez (Molecular Biology Division, Hospital Universitario La Paz, Madrid) for providing the facilities for liver perfusion experiments, Dr Carlos Sanchez, Angeles Muñoz, Verónica Labrador, and Teresa Villalba for skillful assistance with the microscopy, and Dr S. Lutsenko for lending her ATP7B antibody to double-check the results obtained with Ab1.